

# 脊椎動物網膜水平細胞から視細胞へのエファプス連絡

——水平細胞に発現するヘミチャネルとの関連——

高橋 恭一

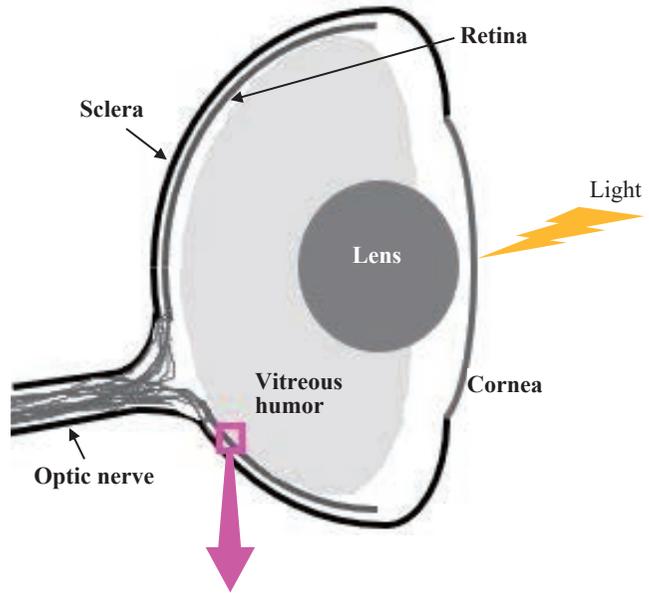
(受付 2018年8月20日)

## 1. はじめに

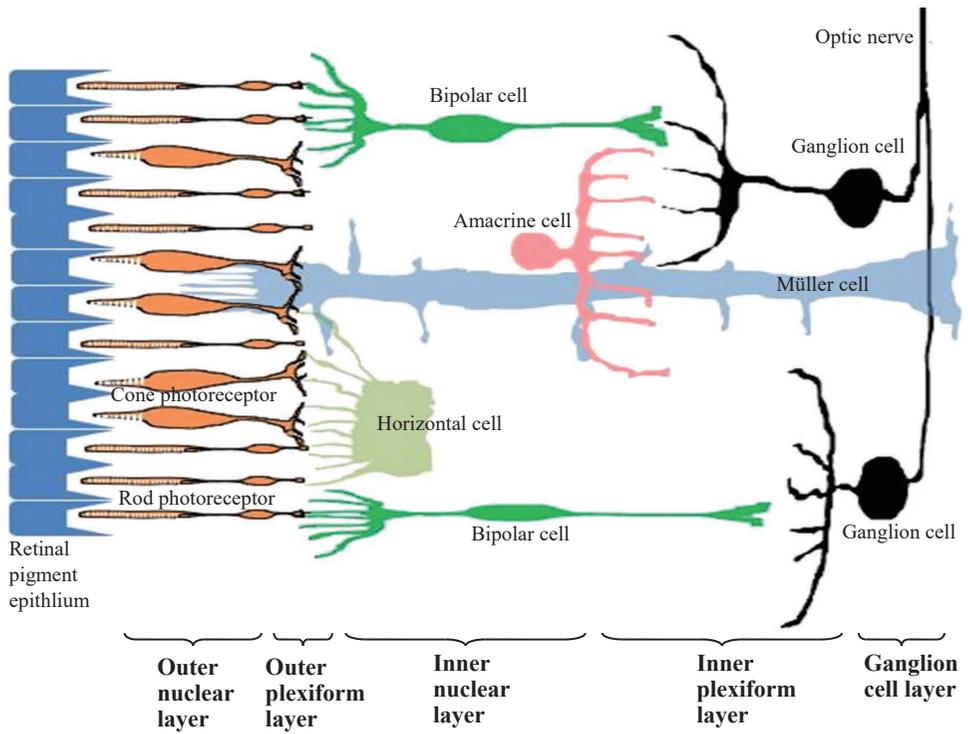
脊椎動物頭部には2つの眼球が備わっており、眼球内に張り付いた網膜によって外界の光変化を検知している。魚類から哺乳類に至るまで眼球の基本的な形状と眼球の構成はよく保存され、そして網膜を構成する神経細胞の種類や配列に関しては基本的に同じであると考えられてきた(第1図参照)。ところが、1950年以降の急速な研究手法の開発に伴い、網膜に動物種差があることが明らかになってきた。

網膜は基本的に5種類の神経細胞で構成され、光受容性を有するのは視細胞のみである。外界の広範な光強度変化に適応するため、脊椎動物網膜視細胞には薄明下で機能する桿体と十分な光量下で機能する錐体が存在する。何れの視細胞においても受容された光は各種の化学反応(酵素反応)を惹起し、最終的に膜電位変化へと変換される。この膜電位変化は化学シナプスならびに電気シナプスを介して第2次神経細胞(双極細胞<sup>1)</sup>と水平細胞)そして第3次神経細胞(神経節細胞とアマクリン細胞)に伝播され、神経節細胞の神経軸索(視神経線維とも呼ばれる。)を経て脳に達する(第1図参照)。網膜内の神経細胞の膜電位変化は視細胞→双極細胞→神経節細胞と直線的に伝達されるが、視細胞と双極細胞の間に水平細胞そして双極細胞と神経節細胞の間にアマクリン細胞が介在し、それぞれのシナプス伝達を修飾している。この修飾によって、視覚情報に空間情報が付加され、それぞれの神経細胞には明確な受容野が表出される。例えば、ON型双極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、この双極細胞の樹状突起(視細胞からシナプス入力を受け取っている領域を指し、中心受容野を意味する。)に光照射を行うと、脱分極性の膜電位変化が惹起される。不思議なことに、樹状突起に光照射をせず、樹状突起の周辺(視細胞からシナプス入力を受け取っている領域以外を指し、周辺受容野を意味する。)に光照射を行うと、過分極性の膜電位変化が惹起される。すなわち、ON型双極細胞の光応答(光照射によって双極細胞に生じる膜電位変化を指す。)は中心受容野と周辺受容野で反対となる。このような受容野を中心-周辺拮抗的受容野と呼ぶ(第2図A参照)。この中心-周辺拮抗的受容野は、物体の輪郭の認識や強調に重要な役割を担っている。かつて、このような中心受容野と周辺受容野の拮抗作用は

A



B



側抑制（あるいは、側方抑制ともいう。）と呼ばれ、感覚生理学および神経生理学の中心課題であった（例えば、Hartline, 1949; Kuffler, 1953）。

双極細胞は中心受容野への光照射によって脱分極性膜電位変化そして周辺受容野への光照射によって過分極性膜電位変化を示す ON 型双極細胞に加え、同様な光照射に対し逆の膜電位変化を示す OFF 型双極細胞が存在する（例えば、Werblin & Dowling, 1969; Kaneko, 1973; Kaneko & Tachibana, 1982; Saito, 1987）。中心受容野への光照射に伴い発生する膜電位変化は視細胞からの双極細胞への化学シナプス（興奮性シナプス）<sup>2)</sup>、そして周辺受容野への光照射に伴い発生する膜電位変化は水平細胞から視細胞へ化学シナプス（抑制性シナプス）を介して形成されると考えられてきた（例えば、Werblin & Dowling, 1969; Toyoda & Tonosaki, 1978; Ishida *et al.*, 1980）。つまり、水平細胞は視細胞－双極細胞間の化学シナプス（興奮性シナプス）を修飾する機能を担っている。水平細胞から視細胞への化学シナプス（抑制性シナプス）は負のフィードバックシナプスとも呼ばれ、水平細胞から放出される神経伝達物質として  $\gamma$ -aminobutyric acid ( $\gamma$ -アミノ酪酸; GABA) が報告されている（例えば、Lam & Steinman, 1971; Lam, 1972, 1975; Marc *et al.*, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Schwartz, 1982, 1987）。1990年代に入ると、錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックに GABA が関与しないという研究が複数現れ、GABA を介する抑制性シナプス説（最近、GABA 説とも呼ばれている。）は懐疑的となった（例えば、Thoreson & Burkhardt, 1990; Burkhardt, 1993; Verweij *et al.*, 1996, 2003; Yazulla & Studholme, 1997）。そして、負のフィードバックに関する新たな 2 説（細胞外電流説と細胞外 pH 説）（現在、細胞外電流説はエファプス

#### 第 1 図：脊椎動物の眼球と網膜

A：脊椎動物の眼球は光を透過するため透明な角膜（Cornea）と白濁した強膜（Sclera）でできている。角膜を通過した光は、水晶体（Lens）と硝子体（Vitreous humor）を経て網膜（Retina）に達する。本図では、眼球内の虹彩（Iris）、房水（Aqueous humor）、毛様体（Ciliary body）、脈絡膜（Choroid）や血管（Retinal blood vessels）などの構造物は省略した。眼球の形態は鳥類や哺乳類では概ね球体であるが、下等脊椎動物では半球に近い。本図 A は魚類の眼球をイメージして描いた。

B：脊椎動物網膜は、5 種類の神経細胞（視細胞 [錐体 [Cone photoreceptor] と桿体 [Rod photoreceptor]]、水平細胞 [Horizontal cell]、双極細胞 [Bipolar cell]、アマクリン細胞 [Amacrine cell] と神経節細胞 [Ganglion cell]）とミュラー細胞（Müller cell）からなる。錐体と桿体は外節部に存在する視物質に光が衝突すると、一連の化学反応（酵素反応）が進行し、最終的に膜電位変化を生む。視細胞での感受された明暗はシナプスを介して縦方向に配置された神経細胞群（双極細胞と神経節細胞）へと伝播される。水平細胞は視細胞と双極細胞の間そしてアマクリン細胞は双極細胞と神経節細胞の間のシナプス接続を修飾し、⑦三原色過程から反対色過程への変換、④中心－周辺拮抗的受容野の形成そして⑤動きや方向選択性の初期過程の形成などに寄与する。視細胞の細胞体が存在する部位は外顆粒層（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は内顆粒層（Inner nuclear layer）と呼ばれている。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は外網状層（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は内網状層（Inner plexiform layer）と呼ばれている。視覚情報は外網状層と内網状層で処理され、その結果が神経節細胞層（Ganglion cell layer）の軸索（視神経 [Optic nerve]）を経て脳へと送られる。ミュラー細胞は網膜を縦方向に貫く大型の細胞であり、網膜のほぼ全域に分布し、神経機能を支えている。

説、細胞外 pH 説は pH 説 [あるいはプロトン説] と呼ばれている。) が浮上してきた (例えば, *Byzov et al.*, 1977; *Kamermans et al.*, 2001; *Hirasawa & Kaneko*, 2003)。現在, これら 3 仮説の何れが負のフィードバックのメカニズムであるのかが網膜生理学の喫緊の課題となっている。

3 仮説の中で, 特にエファプス説に注目が集まっている。この仮説では, 水平細胞から視細胞への負のフィードバックに化学シナプスや電気シナプスといった従来型の神経細胞間接続は関係せず, 新しいタイプの神経細胞間接続が提案されている。19世紀半ばの科学技術が十分に整っていない時代に, *Du Bois-Reymond* (1877) が行った生理学的研究に基づいて考え出された神経細胞間そして神経細胞-筋肉細胞間の興奮伝播に関する仮説が発端となっている。この興奮伝播は神経細胞と神経細胞あるいは神経細胞と筋肉細胞が近接して存在するとき, 活動中の神経細胞に発生した電氣的興奮 (膜電流) が近接する非興奮の神経細胞 (あるいは筋肉細胞) の細胞膜を通過して流れることによるという考え方である (*Du Bois-Reymond* [1877] は神経と筋の接合部にシナプスのイメージを抱いていたのかあるいはエファプスのイメージを抱いていたのかは不明である。神経から筋への興奮伝播が局所回路を通じて電氣的に伝わること以外に, この興奮伝播に神経が分泌する化学物質が関与している可能性を疑っていた。しかし, 化学物質の関与に関しては十分な科学的証拠が示されているわけではない [*López-Munñz & Alamo*, 2009]。)。20世紀に入ると, この接続 (エファプス伝達) の存在を示唆する研究が増えてきたが, 如何せん科学的根拠が不充分であった。こんな中, *Katz & Schmitt* (1940) はエファプス伝達の存在を印象付ける研究を発表した。カニ (*Carcinus maenas*) 脚に存在する神経線維を実験材料にし, 一方の神経線維の電氣的興奮が近接する非興奮の神経線維に影響すること, そしてこの影響には興奮部と非興奮部を流れる局所電流が関与する可能性を示した (*Katz & Schmitt*, 1940)。この2年後, *Arvanitaki* (1942) はイカ (*Sepia officinalis*) の巨大神経線維を用いて *Katz & Schmitt* (1940) と同様の現象を見出し, シナプスを介する神経細胞間接続と区別するためエファプスという術語を導入した。以降, 散発的にエファプス伝達に関する生理学的実験のみならずモデル実験が発表されてきた。

近年, 生理的および病的状態での脊椎動物の中樞神経系そして無脊椎動物および脊椎動物の嗅覚系に加え, 生理的および病的状態の心筋でもエファプス伝達に関する研究が行われ, この伝達の存在が重要視されるようになってきた (例えば, *Dudek et al.*, 1998; *Bokil et al.*, 2001; *Lin & Keener*, 2010; *Su et al.*, 2012; *Veeraraghavan et al.*, 2014; *Stacey et al.*, 2015)。エファプス伝達による神経細胞間接続が成立するため, ⑦神経細胞あるいは神経線維が近接して存在していること, ⑧近接部の細胞外構造がそれ以外の部位と異なっており, 近接部の電気抵抗が高いこと, ⑨近接部とその周辺 (近接部から離れた細胞外) との間に電流の流れ

が存在すること、そして④細胞膜に電流の流れを生む電位依存性イオンチャンネルが存在することが挙げられる。とはいえ、エファプス伝達の生理学的研究は漸く緒に就いたところであり、これまで⑦～④までの総てが調査・解明されたわけではない。

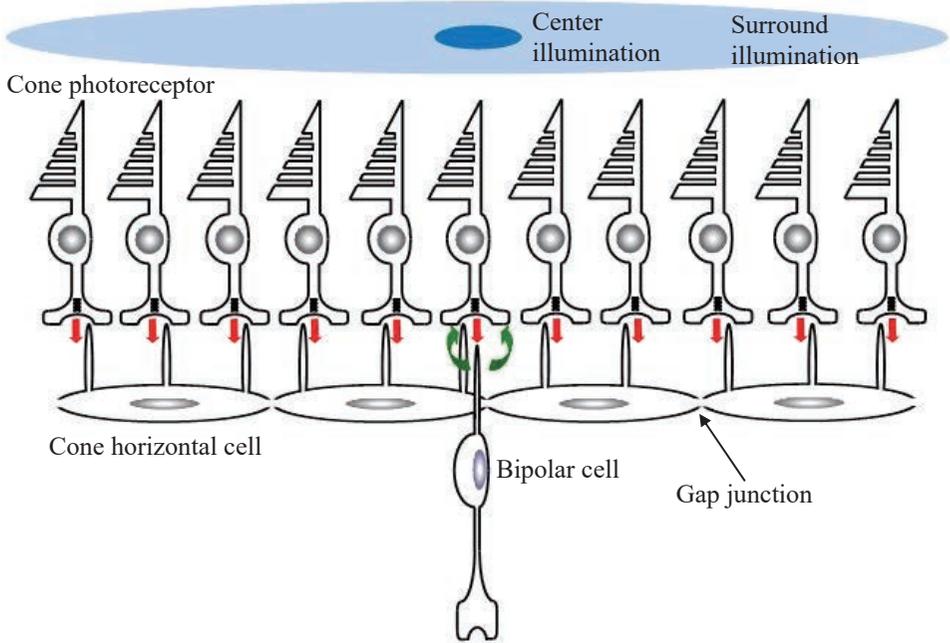
脊椎動物網膜水平細胞から視細胞への負のフィードバックの一つとして提唱されているエファプス説では、水平細胞に発現するヘミチャンネル（ギャップ結合チャンネルを構成するコネクソン [6分子のコネキシンタンパク質の集合体] が半チャンネルのまま細胞膜に存在している状態を指す。）が重要な役割を演じていることが報じられている（例えば、Kamermans *et al.*, 2001）。しかし、既述のようにエファプス説には不明が多く、ヘミチャンネルの関与についても十分な証拠が提供されているとは言い難い状況にある（Kramer & Davenport, 2015; Country, 2017）。近年、ヘミチャンネルは Adenosine-5'-triphosphate (ATP) 放出, L-Glutamate 放出, Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 放出に加え細胞容量調節やストレス下での細胞死などへの関与が報告されているが、生理的条件下でイオン通路として機能しているのか否かについて十分な知見は得られていない（Quist *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2000; Bruzzone *et al.*, 2001; Kamermans *et al.*, 2001; Contreras *et al.*, 2002; Braet *et al.*, 2003; Pottek *et al.*, 2003）。負のフィードバックの一つとして提唱されているエファプス説では水平細胞に発現するヘミチャンネルがイオン通路として機能することが報じられているため、エファプス伝達のみならずヘミチャンネルの機能にも注目が集まっている。

脊椎動物網膜水平細胞から視細胞への負のフィードバックは、中心-周辺拮抗的受容野の形成（第2図A）ならびに三原色過程から反対色過程への変換（第2図B）を支える重要なメカニズムであり、このフィードバックを明らかにするため50年近い間研究が行われてきた。現在、3仮説が提案され、未だ決着を見ていない。本論文ではこれまでの研究成果を踏まえ、特にエファプス伝達およびこの伝達へのヘミチャンネルの関与に着目して調査した。

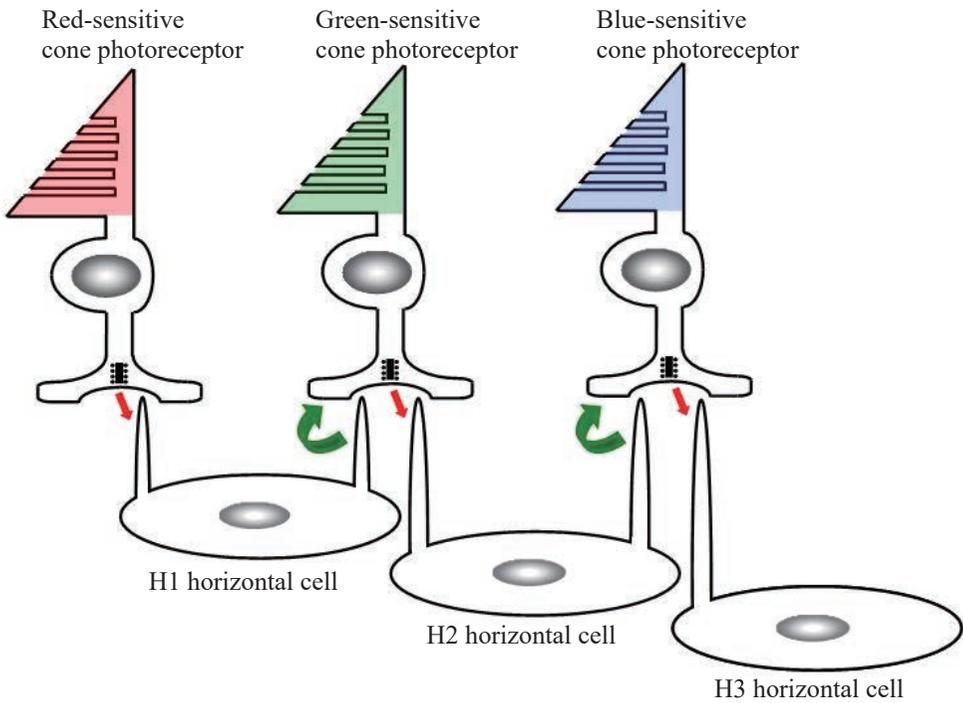
## 2. エファプス<sup>3)</sup> 研究の歴史

19世紀末、Golgiは網状説（脳を構成する要素 [神経細胞] には切れ目がなく、網状になって繋がっているとする仮説）そしてCajalはニューロン説（脳を構成する要素には連続性がなく、それぞれの要素は独立した機能単位であるとする仮説）を提唱し、決着を見ないまま20世紀を迎えた。1950年代半ば、電子顕微鏡が生物に应用されるようになって漸くニューロン説に軍配が上がった（例えば、Palade & Palay, 1954; De Robertis & Bennett, 1955）。結果として、神経細胞の電気的活動は化学シナプスを介して伝達されるという考え方が定着した。爾来、シナプスでは化学的な伝達が主と考えられるようになったが、1960年代に入って電気シナプスが発見され、神経系では化学シナプスのみならず電気シナプスによる情報処理（中

A



B

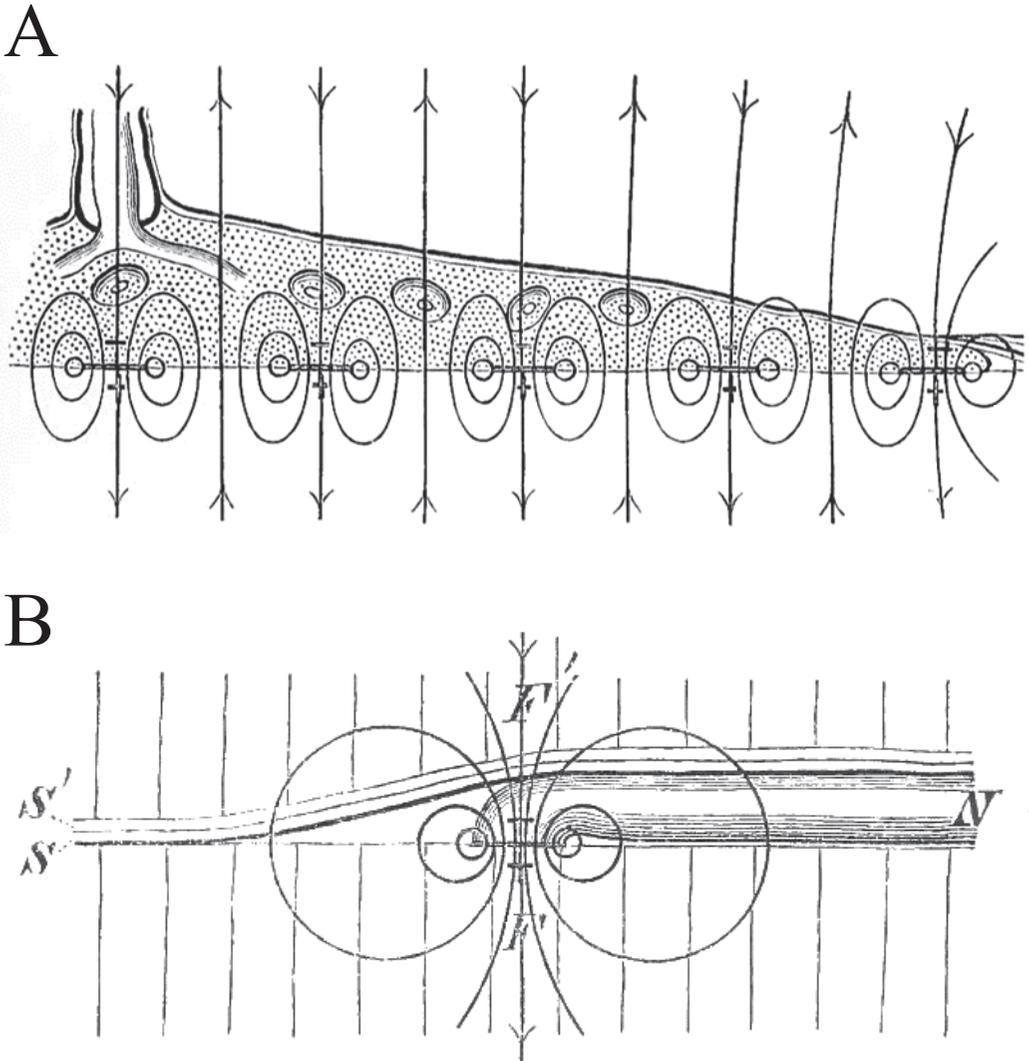


中枢神経系は感覚器で生じた膜電位変化を運動器にまで伝播する情報処理装置だと考えられており、このため「脳での情報処理」あるいは「中枢神経系での情報処理」という表現が多々使われる。)が普遍的であると考えられるようになった(例えば, Bennet *et al.*, 1963; Robertson *et al.*, 1963; Furshpan, 1964)。しかし, ニューロン説が確定し, 化学シナプスと電気シナプスによる神経細胞間接続が明らかになった後も, ニューロン説が提唱される以前に推測されていた神経細胞間接続(シナプスとは異なるタイプの神経細胞間接続を指し, 現在エファプス伝達と表現されることが多い。)が活きていた。

18世紀末, カエル筋肉の収縮に関する観察を踏まえて Galvani (1791) は動物電気説そして Galvani の問題点を修正して Volta (1793) は金属電気説を唱え, 漸く動物に発生する電気現象が脚光を浴びることとなった。1820年以降, Nobili や Matteucci は検流計の改良を試み, 未だ誰も観察したことのない動物電気を検出(観察)する試みを始めた。1840年代に入ると, Du Bois-Reymond が高感度検流計や誘導刺激装置を自作し, 筋肉と神経に発生する微弱な電流を検出・解析することが可能となった(Du Bois-Reymond, 1848, 1849)。しか

#### 第2図: 中心-周辺拮抗的受容の形成(A)と三原色過程から反対色過程への変換(B)

A: 暗時, 錐体(Cone photoreceptor)から放出されたL-Glutamateは双極細胞(Bipolar cell)と錐体水平細胞(Cone horizontal cell)のシナプス下膜に発現するグルタミン酸レセプターに結合し, 膜電位変化を生む(赤色矢印)。この膜電位変化はギャップ結合(Gap junction)を介して近隣の錐体水平細胞へと伝播する。この錐体水平細胞は錐体に対し抑制信号(負のフィードバック)を送る(緑色矢印)。現在, この負のフィードバックの伝播を説明するため, 3仮説(抑制性シナプス説[GABA説], 細胞外電流説[エファプス説]および細胞外pH説[pH説【あるいはプロトン説】])が提唱されている。中心受容野を照射射(Center illumination [濃い青色部分])すると, 錐体は過分極してL-Glutamateの放出を減少あるいは停止し, 結果として双極細胞と錐体水平細胞の膜電位が変化する。黄色部分への照射射を止め, 周辺受容野のみをドーナツ状に照射射(Surround illumination [薄い青色部分])すると, 照射射された錐体とシナプス接続している双極細胞と錐体水平細胞は影響を受け, 膜電位変化が生じる。錐体水平細胞はギャップ結合しているため, たとえドーナツ状の照射射であっても近隣の総ての錐体水平細胞に膜電位変化を伝播し, 過分極が生じる。勿論, 照射射がない中心受容野(濃い青色部分)の錐体水平細胞も過分極するに違いない。この結果, 中心受容野の錐体に対する錐体水平細胞からの負のフィードバックは影響を受ける。このようにして, 双極細胞の中心周辺拮抗的受容野の周辺受容野が形成されると考えられている。B: 色覚を有する下等脊椎動物の網膜には, 3種類の錐体(赤色錐体[Red-sensitive cone photoreceptor], 緑色錐体[Green-sensitive cone photoreceptor]と青色錐体[Blue-sensitive cone photoreceptor])が存在し, それぞれは異なる錐体水平細胞とシナプス接続している(赤色錐体から主入力を受け取る単相性水平細胞[H1 horizontal cell], 緑色錐体から主入力を受け取る二相性水平細胞[H2 horizontal cell]および青色錐体から主入力を受け取る三相性水平細胞[H3 horizontal cell]) (赤色矢印)。Stellの研究グループは, キンギョ網膜のシナプス構造を電子顕微鏡で観察し, 錐体と錐体水平細胞の間に本図のようなシナプス連絡が存在する可能性を報告した(抑制性シナプス説, 現在GABA説と呼ばれている。)(Stell *et al.* (1975)の図を一部改変)(Stell & Lightfoot, 1975; Stell *et al.*, 1975)。単相性水平細胞は赤色錐体から興奮性シナプス入力を受け取り, 緑色錐体に対し負のフィードバックを出力している(緑色矢印)。また, 二相性水平細胞は緑色錐体から興奮性シナプス入力を受け取り, 青色錐体に負のフィードバックを出力している(緑色矢印)。3種類の錐体水平細胞が示す複雑な光応答は, これらのシナプス接続によって形成されると考えられる。このように, 錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックは双極細胞の中心-周辺拮抗的受容野の周辺受容野形成のみならず, 錐体の三原色過程から錐体水平細胞の反対色過程への変換にも関与していると考えられている。



第3図：Du Bois-Reymond (1877) による神経筋伝達（仮説）

A：Du Bois-Reymond は神経線維を電気刺激する陽極にも陰極にも興奮が発生すると考えていた。このため、神経筋接合部の表面に生じる局所電流（図中の楕円形）は、長い矢印によって示されているように興奮作用と抑制作用を交互に繰り返すと推測していた（当時、Du Bois-Reymond は神経筋接合部を筋線維の一部ではないと考えていた。）。B：Du Bois-Reymond は筋肉をより効果的に興奮させるために、局所電流が神経筋接合部でどのように流れるのかに関する幾何学的配置についても考えていた。この図は、筋肉を効果的に興奮させる部位における電流の流れを示している。Du Bois-Reymond による仮説は Katz & Schmidt (1940) の実験を経て、エファプス伝達として現在に受け継がれている。本図は Du Bois-Reymond (1877) 著『Gesammelte Abhandlungen zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysik (第2巻)』に掲載された図を Wellcome Library ([https://archive.org/details/b20416921\\_002](https://archive.org/details/b20416921_002)) からコピーし作製した。

し、当時の実験技術では神経細胞や筋肉細胞に発生する静止電位や活動電位、そして神経細胞と筋肉細胞あるいは神経細胞と神経細胞の間に存在するシナプスなどを調べることができず、検流計によって検出される微弱な電流変化（具体的には、検流計に取り付けられている指針の動きを見て、電流の強弱を判定することを指す。）を指標にして神経細胞や筋肉細胞の機能を推測することが限界であった。このような状況下で、Du Bois-Reymond (1877) は活動中の神経細胞に発生する局所電流が近隣の神経細胞の興奮性に影響する可能性を示した（第3図参照）。後年、この可能性はKatz & Schmitt (1940) によって実験的に証明され、この現象を記述するためにArvanitaki (1942) はエファプスという用語を導入した（1970年代、Sperelakis *et al.* [1977, 2002] によってエファプスとは別に、心筋細胞においてElectric Fieldという考え方が提唱されている）。しかし、Katz & Schmitt (1940) は神経線維周辺を鉍物油で充たす、そしてArvanitaki (1942) は神経線維周辺の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を調整するという非生理的な条件で実験を行っており、にわかにエファプス伝達を信じる状況にはなかった（神経線維周辺を鉍物油で充たすあるいは $\text{Ca}^{2+}$ 濃度をするなどの処理は、細胞外の電気抵抗を高くするためである）。その後も生理的あるいは病的条件下でエファプス伝達に関する研究は数多報じられたが、科学的根拠が不十分なまま長い時が過ぎた（例えば、Noebels & Prince, 1978; Jefferys & Haas, 1982; Chan & Nicholson, 1986; Chan *et al.*, 1988; Ghai *et al.*, 2000; Deans *et al.*, 2007; Radman *et al.*, 2007; Ozen *et al.*, 2010）。

## 2-1 エファプス研究の進展

Weiss *et al.* (2008) はキンギョ (*Carassius auratus*) 脳にあるマウスナー細胞を実験に用い、この神経細胞の活動によって形成される細胞外電場 (Extracellular electrical field) が近接する神経線維の興奮性に影響すること、そしてこの影響が中枢神経系において普遍的である可能性を報じた。また、Blot & Barbour (2014) はマウス (*Mus musculus*) 小脳にあるプルキンエ細胞を実験に用い、この神経細胞に発生する活動電位が近接するバスケット細胞の活動に影響することを見出した。これらの研究は、興奮した神経細胞が細胞周辺に形成する細胞外電場の変化を介して非興奮の神経細胞の電氣的活動に影響することを示唆しており、エファプス伝達が機能している可能性を強く示している。近年、生理的および病的状態での脊椎動物の中枢神経系や無脊椎動物や脊椎動物の嗅覚系に加え、生理的および病的状態の心筋でもエファプス伝達の研究が報じられ、この伝達の可能性が再び議論され始めている（例えば、Dudek *et al.*, 1998; Bokil *et al.*, 2001; Lin & Keener, 2010; Su *et al.*, 2012; Veeraraghavan *et al.*, 2014; Stacey *et al.*, 2015）。

## 2-2 エファプス伝達の生理学

脳内には1千億を凌駕する数の神経細胞が存在し、それぞれは神経突起（神経細胞の神経軸索や樹状突起を指す。）を介して接続している。かつて、神経突起は不連続であるとするニューロン説と連続しているとする網状説とが激しい論争をし、この最中ニューロン説を支持する Sherrington は神経細胞間が連絡する部位にシナプスという名称を与えた（Foster, 1897）。やがて、生物学領域に電子顕微鏡が応用されるようになると、神経突起は不連続であり、その突起間にシナプス間隙が存在することが明らかとなった（例えば、Palade & Palay, 1954; De Robertis & Bennett, 1955）。また、急速な電気生理学の技術的進歩により、シナプス遅延が確認され、シナプスが化学的伝達であることが確定した（例えば、Eccles *et al.*, 1941; Kuffler, 1948; Katz & Miledi, 1965）。

化学シナプスの確定後、シナプス遅延が認められない電気シナプスが発見された（例えば、Bennet *et al.*, 1963; Robertson *et al.*, 1963; Furshpan, 1964）。ニューロン説が確定し、神経細胞は化学シナプスと電気シナプスを介して電気的変化を伝達することが確定してからも、近接する2つの神経突起（あるいは神経線維）の一方の興奮が局所回路を介して他方に伝播するというエファプス伝達の考え方は消えることがなかった。現在、エファプス伝達に関して多くの研究成果が蓄積し、そのメカニズムについても部分的に明らかになってきた。

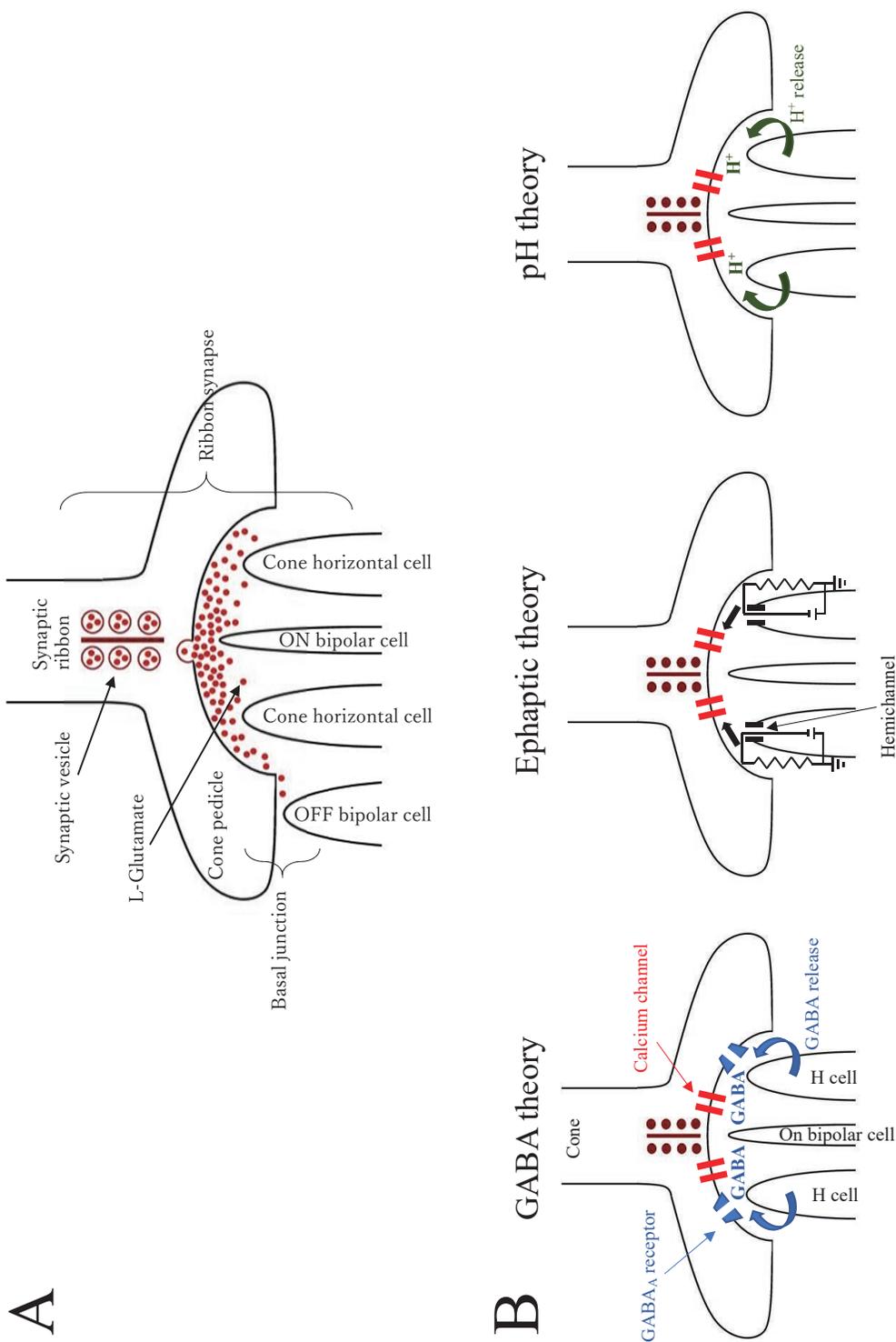
神経細胞にシナプス電位（シナプスの活性化に伴う膜電位変化を指す。）あるいは活動電位が発生する際、この細胞の細胞膜を挟んで各種のイオンが移動する。このため、細胞内外に電位差が生じる。細胞膜を挟んで形成される電位差 ( $V_m$ ) は、細胞内の電位 ( $V_i$ ) と細胞外の電位 ( $V_e$ ) の差 ( $V_m = V_i - V_e$ ) として表現される。多くの神経細胞において、静止状態における  $V_m$  は  $-70 \sim -90$  mV である。これまで、 $V_e$  は一定であると考えられ、慣例的に基準電位 (0 mV) としてきた。しかし、神経細胞あるいは神経線維の細胞膜およびその周辺（細胞外あるいは細胞間隙）に局所的な電気回路（局所回路）が形成され、この回路に電流が流れると  $V_e$  に変化が生じ、結果として  $V_m$  は影響を受けることになる。例えば、細胞膜を通じて細胞外から細胞内に流れ込む電流<sup>4)</sup> は、電流が通過する細胞膜付近の  $V_e$  をマイナス方向に移動させる。つまり、興奮している神経細胞あるいは神経線維の細胞膜を通過する電流は近接する非興奮の神経細胞を脱分極へと導く。反対に、細胞内から細胞外へと流れ出る電流は  $V_e$  をよりプラス方向に移動させるため、非興奮の神経細胞を過分極へと導く。このように、興奮する神経細胞あるいは神経線維の細胞内外で形成される局所回路を流れる電流が近接する非興奮の神経細胞の  $V_m$  に変化をもたらすという考え方をエファプス伝達という（ニューロン説が確定し、化学シナプスおよび電気シナプスを介したシナプス伝達が明らかになった後、シナプス以外で神経細胞間接続が認められるとき、エファプス伝達と呼ばれていた。）。（第3図BのEphaptic theory 参照）。局所回路を流れる電流は微弱であるため、この

電流が  $V_e$  に影響するには回路内の電気抵抗が十分に高いことが必須条件となる。現在、エファプス伝達では興奮している神経細胞に発現するイオンチャンネルが膜電流（陽イオンあるいは陰イオンがイオンチャンネルを通過することによって生じる電流を指す。）を生み、この膜電流が高電気抵抗を持つ局所回路を流れることによって非興奮の神経細胞の  $V_m$  に影響すると推測されている。

Katz & Schmitt (1940) が報じた神経線維間のエファプス伝達では神経線維同士が近接（シナプスではなく、エファプスと推測される。）し、両神経線維の細胞間隙の電気抵抗が極めて高い状態を人工的に作り出した。すなわち、神経線維をリンガー液ではなく、電気的伝導度の低い鉍物油で充たした。結果として、細胞間隙の電気抵抗はリンガー液に比べ格段に高くなってたと推測される。このため、Katz & Schmitt (1940) の実験結果は人工産物であり、生体反応ではないという批判があった。最近、Anastasiou *et al.* (2011) は細胞外の電位差が 0.2 mV 以下でも、近隣の神経細胞の活動電位発生のタイミングに影響することを報じた。つまり、細胞外に大きな電位差が生じなくとも、周囲の神経細胞にはエファプス伝達が成立していることが明らかとなった。しかし、そのメカニズムは充分には解明されているとはいえない。

### 3. 網膜におけるエファプス研究

Byzov *et al.* (1977) は、錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックに細胞外電流（エファプス伝達）が関係するという仮説<sup>5)</sup> を提唱した。後年、再度 Byzov & Shura-Bura (1986) は錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックシグナルが化学シナプス経由ではなく、錐体水平細胞周辺を流れる局所電流が錐体の膜電位変化に影響するという細胞外電流説（最近、エファプス説と呼ばれている。）を主張した。しかし、この仮説は十分な科学的根拠を示すことが難しく、結果として長い間考慮されないままとなっていた。Kamermans *et al.* (2001) は錐体シナプス終末陥入部が特殊な構造を有すること（陥入部の入り組んだ構造が細胞外電気抵抗を高くしている可能性がある。）（第4図A参照）そして水平細胞にヘミチャンネルが発現すること（陥入部に入り込んでいる水平細胞の樹状突起に発現するヘミチャンネルを介して膜電流が発生する可能性がある。）に着目し、水平細胞の膜電位変化に伴い錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙に電位変化が生じ、結果として錐体シナプス終末に発現する電位依存性カルシウムチャンネル<sup>6)</sup> を修飾するという細胞外電流説（現在、エファプス説と呼ばれている。）を支持する報告をした。また、細胞外の電気抵抗に関し、錐体シナプス終末が陥入するという特殊な構造をしているのに加え、Proteoglycan（プロテオグリカン）のような細胞外基質が電気抵抗上昇に寄与していることを想定した（Klaassen *et al.*, 2012）。現在も、Kamermans



の研究グループは錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックにエファプス伝達の関与を信じ、鋭意研究を進めている（例えば、Klaassen *et al.*, 2011; Vroman *et al.*, 2014）。

### 3-1 錐体と錐体水平細胞の接続

錐体と第2次神経細胞（双極細胞と錐体水平細胞）は、化学シナプスを介して接続している。錐体シナプス終末の細胞膜は陥入<sup>7)</sup>（くぼみ）している（第4図A参照）（Missotten, 1965; Stell, 1965; Dowling & Boycott, 1966; Dowling & Werblin, 1969; Stell & Lightfoot, 1975）。このくぼみに双極細胞と錐体水平細胞の樹状突起が進入して化学シナプスを形成している（第4図A参照）。このため、錐体と第2次神経細胞の化学シナプスを陥入型シナプスと呼ぶことがある。錐体シナプス終末にはシナプス小胞を含むシナプスリボンが存在し、このリボンの正面にはON型双極細胞の樹状突起そしてその両側に錐体水平細胞の樹状突起が並んでいる（第4図A参照）（例えば、Dowling & Werblin, 1969）。シナプスリボンを構成するシナプス小胞は、錐体の脱分極（暗時、脊椎動物網膜視細胞〔錐体と桿体〕は脱分極状態にある。）に伴いL-Glutamateを放出している（例えば、Miller & Schwartz, 1983; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen & Jahr, 1989; Schmitz & Witkovsky, 1996, 1997）。また、OFF型双極細胞の一部は錐体シナプス終末のシナプスリボンと異なる部位でシナプス接続している（陥入部ではなく、その外側でシナプス接続している〔ベーサルジャンクション【Basal junction】とも呼ばれている。〕）（第4図A参照）（例えば、Dowling & Boycott, 1966; Kolb, 1970; Lasansky, 1971, 1973）。そして、ベーサルジャンクションではリボンシナプスから漏

#### 第4図：錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックに関する3仮説

A：脊椎動物網膜の錐体シナプス終末（Cone pedicle）には陥入（くぼみ）が存在し、第2次神経細胞はこのくぼみに樹状突起を伸ばし、シナプス接続している（このシナプスはリボンシナプス〔Ribbon synapse〕と呼ばれ、暗時に錐体内Ca<sup>2+</sup>上昇によりシナプスリボン〔Synaptic ribbon〕からシナプス小胞〔Synaptic vesicle〕が離れ、錐体の細胞膜と融合して小胞内のL-Glutamateを放出する。）。暗時、錐体が放出したL-Glutamateは拡散し、双極細胞（ON型双極細胞〔ON bipolar cell〕）とOFF型双極細胞〔OFF bipolar cell〕ならびに錐体水平細胞（Cone horizontal cell）のシナプス下膜に発現するシナプスレセプター（グルタミン酸レセプター）に到達・結合して膜電位変化を引き起こす。錐体シナプス終末のシナプスリボンの正面にON型双極細胞が、またその脇に錐体水平細胞が位置している。OFF型双極細胞はON型双極細胞および錐体水平細胞と異なり、シナプスリボンが存在しない部位で錐体とシナプス接続している。この接続をベーサルジャンクション（Basal junction）という。B：錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックのメカニズムとして現在3仮説が報じられている。GABA説（GABA theory）では、錐体水平細胞の脱分極に伴いGABAが放出され、これが錐体シナプス終末のGABA<sub>A</sub>レセプターを活性化して過分極を引き起こし、この過分極が電位依存性カルシウムチャネル活性を抑制する。エファプス説（Ephaptic theory）では、錐体水平細胞のシナプス下膜に発現するヘミチャネル（Hemichannel）を介するイオン流（膜電流）がシナプス間隙（細胞外）に局所電流を発生し、この結果細胞外電位に変化が生まれ錐体シナプス終末の電位依存性カルシウムチャネル活性に影響する。pH説（pH theory）では、錐体水平細胞の脱分極によって錐体シナプス終末陥入部のシナプス間隙にH<sup>+</sup>が増加し、この増加が錐体シナプス終末の電位依存性カルシウムチャネル活性を抑制する。

れ出た L-Glutamate が拡散し、OFF 型双極細胞の樹状突起に到達することが報じられている (Devries *et al.*, 2006; Szmajda & DeVries, 2011)。

Baylor *et al.* (1971) はカメ (*Pseudemys scripta elegans*) 網膜の錐体にガラス管微小電極を刺入し、膜電位変化を導出し実験に用いた。網膜に大きさの異なる光刺激 (70  $\mu\text{m}$  と 600  $\mu\text{m}$  の円型光照射) を与えたとき、⑦ 600  $\mu\text{m}$  の円型光照射に対する膜電位変化は 70  $\mu\text{m}$  の円型光照射に対する膜電位変化よりも小さいことに加え、④ 70  $\mu\text{m}$  の円型光照射によって錐体が過分極しているとき、これに重ねて 600  $\mu\text{m}$  の円型光照射を行うと、脱分極性光応答が現れることを明らかにした。この脱分極性光応答の発生機序を探るため、錐体と錐体水平細胞の両細胞にガラス管微小電極を刺入し、錐体水平細胞を過分極させる通電刺激を与えると、錐体に脱分極性の膜電位変化が現れた。この通電実験は、錐体水平細胞から錐体に対し抑制作用を有することを示していた。後年、Toyoda & Tonosaki (1978) も錐体水平細胞への通電実験を実施し、Baylor *et al.* (1971) の結果を支持した。Baylor *et al.* (1971) による報告後、Lam の研究グループは魚類網膜水平細胞が GABA を神経伝達物質として放出していることを明らかにし、GABA が水平細胞か視細胞への抑制作用の原因物質である可能性を示した (例えば、Lam & Steinman, 1971; Lam, 1972, 1975; Lam *et al.*, 1978; Lam *et al.*, 1979)。これらの研究は、錐体水平細胞から錐体への抑制作用が GABA を神経伝達物質とする化学シナプスによって伝達されることを示す有力な証拠となった。この抑制作用を示す化学シナプスは、抑制性シナプスあるいは負のフィードバックシナプスと呼ばれた。これが、抑制性シナプス説 (現在、GABA 説と呼ばれている。) である。

Baylor *et al.* (1971) の研究報告以降、ガラス管微小電極を刺入した錐体を広範囲に光照射する、あるいはガラス管微小電極を刺入した錐体を避けてドーナツ状に光照射すると、錐体に脱分極性の膜電位変化が現れる報告が現れた (第 2 図 A 参照) (例えば、O'Bryan, 1973; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Gerschenfeld *et al.*, 1981; Lasansky, 1981)。そして、Gerschenfeld & Piccolino (1980) は錐体が脱分極状態にあるとき、カルシウムチャネルが活性化していることを見出した。これらの研究成果を踏まえ、Gerschenfeld *et al.* (1981) は錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックに、細胞外電流説 (エファプス説) と抑制シナプス説 (GABA 説) が関与している可能性を指摘した。

DeVries (2001) は錐体シナプス終末内に存在するシナプス小胞への L-Glutamate の充填に ATP 依存性水素イオン ( $\text{H}^+$ ) ポンプが機能していることを見出し、シナプス小胞内に L-Glutamate と  $\text{H}^{+8}$  が充填されることを明らかにした。そして、シナプス小胞が L-Glutamate を放出する際  $\text{H}^+$  も同時に放出され、この  $\text{H}^+$  によってシナプス間隙の  $\text{H}^+$  濃度が変化し、錐体に発現するカルシウムチャネル活性に影響を与える可能性を示した。その後、Hirasawa & Kaneko (2003) は錐体シナプス終末陥入部の細胞外  $\text{H}^+$  濃度変化が錐体水平細胞から錐体へ

の負のフィードバックに関係することを明らかにした。これが細胞外 pH 説（現在、pH 説 [あるいはプロトン説] と呼ばれている。）である。

以上のように、水平細胞から視細胞への負のフィードバックに関し、現在、エファプス説、GABA 説と pH 説の 3 仮説が提唱され、何れが真のメカニズムとして機能しているのかが未だ明らかになっていない。

### 3-1-1 GABA 説（抑制性シナプス説）

Stell の研究グループはキンギョ (*Carassius auratus*) 網膜を用い、錐体と錐体水平細胞の間のシナプス接続を電子顕微鏡観察し、水平細胞が錐体からのシナプス入力を受け取るのみならず、錐体に対してシナプス出力している可能性を示した (Stell & Lightfoot, 1975; Stell *et al.*, 1975)。この観察に基づき、錐体での三原色過程が錐体水平細胞の反対色過程に変換されるしくみとして負のフィードバックシナプスモデル (あるいは、抑制性シナプスモデルともいう。) を提唱した。このモデルは抑制性シナプス説 (GABA 説) の形態学的裏付けとして多くの研究者に受け入れられた (第 4 図 B 参照)。時期を同じくして、単相性水平細胞から放出される神経伝達物質は GABA であることが生化学的および免疫組織学的手法を用いて明らかにされた (Lam & Steinman, 1971; Lam, 1972, 1975; Marc *et al.*, 1978; Lam *et al.*, 1978, 1979; Schwartz, 1982, 1987, 2002)。

水平細胞の細胞膜には GABA トランスポーターが発現している (Lam & Steinman, 1971; Schwartz, 1982, 1987, 2002)。この GABA トランスポーターは、GABA を細胞外から細胞内へ輸送 (取り込み) するのみならず細胞内から細胞外へ輸送 (放出) する機能も有している (Schwartz, 1982, 1987, 2002)。通常の化学シナプスにおける神経伝達物質の放出と異なり、このトランスポーターによる GABA 放出は  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とせず、膜電位変化 (脱分極) にのみ依存することが突き止められた (Schwartz, 1982, 1987, 2002)。暗時に錐体水平細胞は脱分極した状態にあるため、⑦錐体水平細胞内の GABA は GABA トランスポーターを介して細胞外に輸送 (放出) され、シナプス間隙を拡散して錐体シナプス終末に到達し、①錐体シナプス終末に発現する  $\text{GABA}_A$  レセプターを活性化してクロライドチャンネル<sup>9)</sup> を開口し、錐体を過分極させる、この結果⑧錐体神経終末に発現するカルシウムチャンネル活性が低下し、錐体から放出される L-Glutamate 量が減少すると考えられた (Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Mrakami *et al.*, 1982a, b; Kaneko & Tachibana, 1986)。

1980年代に入ると、網膜内から単離・培養した神経細胞にパッチ電極を利用した研究法 (パッチクランプ法) が確立し、ガラス管微小電極法では困難であった単一神経細胞 (神経組織から酵素処理などの方法で神経細胞を単離し、単一神経細胞を他の神経細胞との接続を完全に断った状態でリンガー液中に維持した標本を指す。) に発生する膜電流の解析が可能と

なった。Kaneko & Tachibana (1986) は、カメ (*Geoclemys reevesii*) 網膜にパッチクランプ法を適用し、網膜から単離した単一錐体の神経終末に GABA 感受性を見出した。この研究は、水平細胞から錐体への負のフィードバックが化学シナプス (抑制性シナプス) を介して伝播されることを強く示唆していた。また、この抑制性シナプスに GABA が関与することはコイ網膜を用いた Murakami *et al.* (1982a, b) の実験でも報告されており、抑制性シナプス説 (GABA 説) は確定的となった。

### 3-1-2 エファプス説 (細胞外電流説)

Baylor *et al.* (1971) の研究に基づき、Byzov *et al.* (1977) は水平細胞のシナプス下膜<sup>10)</sup>に惹起される膜電流が錐体シナプス終末のシナプス間隙を横切る際に、錐体の膜電位に影響するという仮説 (細胞外電流説 [現在、エファプス説と呼ばれている。]) を発表した。その後も、Byzov & Shura-Bura (1986) は錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックシグナルが化学シナプスではなく、電気的に伝播される細胞外電流説を主張した。この仮説では錐体と第 2 次神経細胞 (双極細胞と錐体水平細胞) の間の化学シナプスが陥入型を呈するため、シナプス間隙の電気抵抗が高いことを想定している (第 4 図 A 参照)。暗時に錐体が L-Glutamate を放出すると、錐体シナプス終末に近接する錐体水平細胞のシナプス下膜にはグルタミン酸電流が発生する。この膜電流はシナプス間隙とシナプス外 (シナプス間隙周辺の細胞外) の間に形成される局所回路を流れ、錐体水平細胞と錐体の間のシナプス間隙をマイナスへと導き、結果として錐体シナプス終末の膜電位を脱分極に誘う。つまり、高い電気抵抗を持つ局所回路をグルタミン酸電流が流れることで、シナプス間隙に電位差が生まれ、最終的に錐体の膜電位に影響する。

最近、Kamermans *et al.* (2001) は、Byzov & Shura-Bura (1986) が発表した細胞外電流説を補強すべく、生理学および免疫組織化学的実験を行った。この結果、錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙を流れる電流成分として、錐体水平細胞に惹起されるグルタミン酸電流に加え、錐体水平細胞膜に発現するヘミチャネルを介する膜電流が関与することを報告した (第 4 図 B 参照)。実際、ヘミチャネルが錐体水平細胞の樹状突起に発現していること (錐体シナプス終末陥入部に進入した錐体水平細胞のシナプス下膜 [樹状突起の先端部] に発現している。) を免疫組織化学的手法によって明らかにした。明暗変化に伴う錐体水平細胞の膜電位変化がヘミチャネルの開閉状態を変え、錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙を流れる電流に影響し、最終的に錐体の膜電位を変えると推測した。そして、Kamermans *et al.* (2001) は錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックが錐体の膜電位に影響し、錐体に発現する電依存性カルシウムチャネル活性に影響することも明らかにした。

### 3-1-3 pH 説 (細胞外 pH 説)

Hirasawa & Kaneko (2003) は、イモリ (*Cynops pyrrhogaster*) 網膜のスライス標本を用いて錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックに関する生理学的実験を行った。この標本を灌流するリンガー液に大量の pH 緩衝剤 (*N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid [HEPES] や Tris-hydroxymethyl-aminomethane [Tris] など) を加えて  $H^+$  濃度 (pH) 調節能を強化したとき、周辺受容野への光照射に伴う錐体の光応答が減弱することを見出し、この減弱に細胞外の  $H^+$  が関与していることを明らかにした (第 4 図 B 参照)。実験では、①周辺受容野を光照射すると錐体の電位依存性カルシウムチャネル活性が上昇 (カルシウム電流が増大する。) すること、②カルシウム電流の増大は細胞外  $H^+$  濃度の減少 (アルカリ化) によって顕著となること、さらに③スライス標本を灌流するリンガー液の pH 緩衝能を高めるとカルシウム電流は増大し、このため周辺光応答 (周辺受容野への光照射に伴い錐体に惹起される膜電位変化を指す。) が相殺されることを示した。これらに基づき、周辺受容野への光照射に伴う錐体水平細胞の過分極は錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙の  $H^+$  濃度を減少させ、錐体のカルシウム電流を増強 (電位依存性カルシウムチャネル活性を上昇させる。) させることによって錐体から放出される L-Glutamate 量を増加に導くと推測した。つまり、中心受容野への光照射に伴い錐体-錐体水平細胞間シナプス間隙に  $H^+$  濃度の下降、また周辺受容野への光照射に伴い錐体-錐体水平細胞間シナプス間隙に  $H^+$  濃度の上昇が生じることによって、錐体のカルシウムチャネルの活性が調整されることを明らかにした。これが pH 説の考え方である。Hirasawa & Kaneko (2003) は錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙の pH 測定を試みたが、残念ながら成功していない。Vessey *et al.* (2005) と Cadetti & Thoreson (2006) は同様の実験を行い、pH 説を支持する結果を得た。さらに、霊長類網膜神経節細胞の周辺受容野が細胞外  $H^+$  に依存していることを見出し、この原因が水平細胞から錐体への負のフィードバックに細胞外  $H^+$  が関与していることも明らかにされている (Davenport *et al.*, 2008)。

近年、錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙の  $H^+$  濃度変化の研究も進められており、シナプス間隙に  $H^+$  を供給する経路ならびにシナプス間隙の pH 緩衝能に関する知見が蓄積しつつある。DeVries (2001) は、リス (*Spermophilus tridecemlineatus*) 網膜を用い、錐体シナプス終末から L-Glutamate が放出される際同時に  $H^+$  も放出されることを報じた。錐体シナプス終末から放出された L-Glutamate は再利用されるため、錐体シナプス終末に発現するグルタミン酸トランスポーターを介して L-Glutamate がシナプス終末内に取り込まれる (Tachibana & Kaneko, 1988; Eliasof & Werblin, 1993; Picaud *et al.*, 1995a, b; Yang & Wu, 1997; Eliasof *et al.*, 1988a, b)。この L-Glutamate がシナプス小胞に充填される際、小胞に発現する ATP 依存性  $H^+$  ポンプ (vesicular  $H^+$  ATPase あるいは vesicle type  $H^+$  pump) が

機能し、L-Glutamate と同時に  $H^+$  も取り込まれシナプス小胞内に蓄積する。このため、暗時に錐体が L-Glutamate を放出するとき、 $H^+$  も放出される。この  $H^+$  によって、錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙は他の細胞外よりも酸性となる可能性がある。Vessey *et al.* (2005) は魚類網膜水平細胞に上皮性ナトリウムチャンネルが発現し、これが錐体シナプス終末シナプス間隙に  $H^+$  を供給する可能性を示した。また、Warren *et al.* (2016b) は錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙への  $H^+$  供給源として、⑦細胞外に存在する Carbonic anhydrase (炭酸脱水酵素) (炭酸脱水酵素は二酸化炭素と水を  $H^+$  と重碳酸イオン [ $HCO_3^-$ ] に変換する酵素であり、この酵素が活性化すると細胞外の  $H^+$  は上昇する。)、⑧液胞型  $H^+$  ポンプおよび⑨  $Na^+/H^+$  エクスチェンジャー ( $Na^+/H^+$  エクスチェンジャーは細胞内の  $H^+$  を細胞外に排出するため、細胞外  $H^+$  濃度が上昇する。)の可能性を示した。さらに、Warren *et al.* (2016b) は重碳酸イオン輸送系の抑制剤である 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) が水平細胞から錐体への負のフィードバックを減弱することから、細胞外  $H^+$  濃度調整に重碳酸イオン緩衝系 (Bicarbonate buffer system) が関与している可能性を指摘している。

### 3-2 錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックに関する 3 仮説の是非

錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックのメカニズムに関し、1970年代に GABA 説 (抑制性シナプス説) とエファプス説 (細胞外電流説)、そして2000年に入って pH 説 (細胞外 pH 説) の 3 仮説が発表された。それぞれの仮説を支持する幾多の研究報告がある一方で、不支持を表明する研究報告も現れ、現在も 3 仮説を検証するための実験が進められている。

GABA 説に関しては、1980年代後半まで多くの下等脊椎動物網膜を用いた研究で支持された。しかし、1990年代に入り、電気生理学的、神経化学的および神経薬理学的手法の発展に加え、免疫組織化学的手法を用いた研究が登場し、GABA 説を否定する論文が発表されるようになった。否定の根拠として、⑦ GABA およびこのアゴニストやアンタゴニストが錐体や錐体水平細胞に対し顕著な効果を示さないこと、⑧錐体のクロライドイオン (塩化物イオンともいう。) ( $Cl^-$ ) の平衡電位 (錐体シナプス終末には GABA<sub>A</sub> レセプターが発現し、このレセプターが活性化すると  $Cl^-$  に対する透過性が上昇する。) が暗時の膜電位と概ね同じかあるいはむしろ脱分極側にあること、そして⑨錐体シナプス終末に GABA レセプター<sup>11)</sup> が殆ど存在しないことなどが報じられたことが挙げられる (例えば、Thoreson & Burkhardt, 1990; Burkhardt, 1993; Verweij *et al.*, 1996, 2003; Yazulla & Studholme, 1997)。現在、下等脊椎動物網膜水平細胞には GABA トランスポーターが発現し、このトランスポーターを介する  $Ca^{2+}$  非依存型 GABA 放出機構が機能していることが報じられ、GABA 説の火は細々と燃え続けている (Schwartz, 1982, 1987, 2002)。しかし、哺乳動物の水平細胞に GABA トランスポーターが発現するという研究報告がなく、GABA 説は否定的である (例えば、

Johnston *et al.*, 1996)。

エファプス説に関しては、Byzov *et al.* (1977) による実験とシミュレーションに始まり、Kamermans *et al.* (2001) が錐体水平細胞に発現するヘミチャンネル<sup>12)</sup> が関与している可能性を示したことにより近年脚光を浴びている。しかし、錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙の電気抵抗の測定は依然行われておらず、また錐体の電位依存性カルシウムチャンネル活性がヘミチャンネルを介するエファプス伝達の影響を受けるという直接的証拠も示されていない。Dmitriev & Mangel (2006) はコンピュータシミュレーションを用いてエファプス説の妥当性について検討し、エファプスが錐体シナプス終末の膜電位およびカルシウムチャンネル活性に影響するほど十分な電位差を細胞外に生じないことを報じた。これに加えて、Cadetti & Thoreson (2006) はサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) 網膜を用いた実験において、ギャップ結合チャンネル阻害剤である Carbenoxolone (カルベノキソロン) が錐体の電位依存性カルシウムチャンネル活性に影響を及ぼさないことを見出した。また、Vessey *et al.* (2004) は Carbenoxolone が錐体水平細胞から錐体への負のフィードバック信号を抑制すると同時に、錐体シナプス終末の電位依存性カルシウムチャンネル活性を直接低下させることを明らかにした。Cadetti & Thoreson (2006) や Vessey *et al.* (2004) の実験では、錐体水平細胞のヘミチャンネル活性の抑制が錐体の電位依存性カルシウムチャンネルの活性を低下させることに失敗している。さらに、Klaassen *et al.* (2011) はコネキシン55.5 (Cx55.5) が欠落したゼブラフィッシュ突然変異腫を製作し、この網膜を利用して錐体水平細胞から錐体への負のフィードバック信号に対するヘミチャンネルの影響を調査した。この突然変異腫網膜では負のフィードバック信号に減弱が認められたものの、完全に抑制することはできなかった。これらを踏まえ、エファプス説を支持する研究者は多いとはいえない状況にある。エファプス説が錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックのメカニズムとして機能することを証明するにはさらなる研究が必要である。

pH 説に関しては、シナプス間隙に存在する  $H^+$  がまるで神経伝達物質 (あるいは神経修飾物質) のように錐体シナプス終末の電位依存性カルシウムチャンネル活性を変えるため注目を集めている (Hirasawa & Kaneko, 2003)。しかし、依然錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙の  $H^+$  がどのように変化するのが不明のままである。Malchow の研究グループ (Molina *et al.*, 2004; Kreitzer *et al.*, 2007) は、魚類 (エイ [*Raja erinacea* と *Raja ocellata*] とナマズ [*Ictalurus punctatus*]) 網膜から単離した水平細胞を用いて、細胞外 pH が L-Glutamate などの化学物質によってどのように変化するかを調査し、pH 説を否定した。この研究では、L-Glutamate 投与に伴い水平細胞の近隣 (水平細胞の細胞外周辺部分) がアルカリ化することを見出した。原因として、L-Glutamate 投与に伴う錐体水平細胞の脱分極が電位依存性カルシウムチャンネルを活性化して細胞内に  $Ca^{2+}$  が流入し、続いて錐体水平細胞膜に発現す

る  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  ATPase が活性化して  $\text{Ca}^{2+}$  を細胞外そして  $\text{H}^{+}$  を細胞内に交換輸送するためであることを突き止めた (Kreitzer *et al.*, 2007)。さらに、キンギョ (*Carassius auratus*) 網膜から単離した錐体水平細胞に pH 感受性色素とガラス管微小電極を併用した実験を行い、水平細胞の脱分極は細胞外  $\text{H}^{+}$  を減少させることを明らかにした (Jacoby *et al.*, 2012)。これらの研究成果を踏まえると、錐体水平細胞の脱分極は錐体シナプス終末陥入部内シナプス間隙の細胞外  $\text{H}^{+}$  を増加ではなく、減少させる可能性が高い。他方、Jouhou *et al.* (2007) はコイ (*Cyprinus carpio*) とキンギョ (*Carassius auratus*) 網膜から単離した水平細胞を実験に用い、水平細胞の脱分極に伴い周辺の細胞外  $\text{H}^{+}$  は増加し、この増加に液胞型  $\text{H}^{+}$  ポンプ (vacuolar  $\text{H}^{+}$  ATPase あるいは vacuolar type  $\text{H}^{+}$  pump) が関与する可能性を報じた。これらの研究では、網膜から水平細胞を単離する過程で錐体シナプス終末陥入部に入り込んだ錐体水平細胞の樹状突起 (シナプス下膜) が消失しているという批判があり、現在単離水平細胞を用いない研究が進められている。pH 説では錐体水平細胞の脱分極によって細胞外  $\text{H}^{+}$  が増加するメカニズムが不明であるが、現在この仮説が有力視されている。

### 3-3 負のフィードバックに関する 2 説の合体 —その可能性—<sup>13)</sup>

Vroman *et al.* (2014) は魚類網膜 (キンギョ [*Carassius auratus*] とゼブラフィッシュ [*Danio rerio*]) の網膜を用いた実験を行い、錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックが異なる時定数を持つ 2 つの成分からなることを見出した。そして、時間差のない成分 (速い成分) はエファプス説そして時定数が約 200 msec の成分 (遅い成分) は pH 説による可能性を指摘した。Warren *et al.* (2016a) も負のフィードバックが 2 成分からなることを報告している。

時間差のない成分にはコネクシン (Cx26 [キンギョ], Cx55.5 [ゼブラフィッシュ]) が関与し、エファプス伝達によって錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックが形成される (Kammerman *et al.*, 2001; KLaassen *et al.*, 2011; Vroman *et al.*, 2014)。錐体水平細胞に発現するヘミチャネルを流れるイオンによって惹起される膜電流の逆転電位が 0 mV 付近にあることを考慮すると、錐体水平細胞が脱分極している状態ではヘミチャネルを流れる膜電流は減少していると推測される。このため、シナプス間隙とシナプス外 (シナプス間隙以外の周辺部) の間に電流の流れは生じにくく、錐体シナプス終末に発現する電位依存性カルシウムチャネルが影響を受ける可能性は低い。つまり、負のフィードバックは錐体水平細胞の脱分極によって減少もしくは消失する。反対に、錐体水平細胞が過分極している状態ではヘミチャネルを流れる膜電流は増加し、シナプス間隙はシナプス外に比べてよりマイナスとなるため、シナプス外からシナプス間隙への電流の流れ込みが生じる。このため、錐体シナプス終末は脱分極し、電位依存性カルシウムチャネルは活性化して負のフィードバックが顕著となる。

このように、ヘミチャネルが関与するエファプス説では錐体水平細胞が過分極することによって、負のフィードバックが増大すると考えられている（例えば、Kamermans *et al.*, 2001; Cenedese *et al.*, 2017）。

時間経過の遅い成分にはパネキシンチャネル<sup>14)</sup>の関与し、このチャネル活性の増減に伴う細胞外  $H^+$  濃度変化が負のフィードバック信号に影響する（pH 説）（Prochnow *et al.*, 2009; Kranz *et al.*, 2012; Vroman *et al.*, 2014; Cenedese *et al.*, 2017）。錐体水平細胞にはパネキシン 1（Panx1）チャネルが発現し、ヘミチャネルのように細胞膜に物質通路を形成している。錐体水平細胞が脱分極すると、このチャネルを通じて ATP が錐体水平細胞の樹状突起周辺（細胞外）に放出する可能性がある（例えば、Bao *et al.*, 2004; MacVicar & Thompson, 2010）。細胞外で ATP は酵素（Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 と Adenosine deaminase）によって加水分解され、AMP、リン酸基そして  $H^+$  に分解される。この結果、細胞外には  $H^+$  濃度調節機能を有するリン酸緩衝系（ $pK_a=7.2$ ）が形成され、シナプス間隙の  $H^+$  は増加に転ずる。この結果、錐体に発現する電位依存性カルシウムチャネル活性は低下する（Vroman *et al.*, 2014; Cenedese *et al.*, 2017）。水平細胞が過分極すれば、Panx1 チャネルは閉塞して ATP 放出は減少あるいは消失するため、シナプス間隙の  $H^+$  は増加せず、錐体のカルシウムチャネル活性は元に戻る。このように、パネキシンが関与する pH 説では錐体水平細胞の膜電位が脱分極しているときに錐体のカルシウムチャネルが活性化し、結果として負のフィードバックの影響が増大すると推測される。

現在提案されているエファプス説と pH 説の合体説が正しければ、錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックは錐体水平細胞の膜電位に依存せず機能している可能性がある（Vroman *et al.*, 2014; Cenedese *et al.*, 2017）。

#### 4. 終わりに

脊椎動物網膜の錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックに関し、現在 3 仮説が提唱されているが、何れの仮説にも十分な証明がない。

エファプス説はヘミチャネルが電流源となることが示唆されているが、電流の強さや細胞外の電気抵抗の測定が行われていない。さらに、ヘミチャネル阻害剤が無効であることや遺伝子操作によって特定コネキシンタンパク質を排除することによって、錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックが完全に抑制されないことなどを考慮すると、エファプス説を証明するには相当の忍耐が必要である。近年、ヘミチャネルは物質通路としての機能が注目を集めており、網膜での調査が必要となっている。

pH 説は錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙の  $H^+$  濃度の変化がどのように生じるのか

不明であるが、㊦ Panx1 が ATP を細胞外へ排出し、細胞外にリン酸緩衝系を形成することで細胞外  $H^+$  濃度を増加する可能性 (Vroman *et al.*, 2014; Canedese *et al.*, 2017)、㊧細胞外に  $H^+$  を供給するために  $Na^+/H^+$  エクスチェンジャーが機能し、さらに細胞外  $H^+$  濃度変化に重炭酸緩衝系が関与している可能性 (Warren *et al.*, 2016a)、そして㊨細胞外  $H^+$  濃度上昇に  $H^+$  に透過性を有する上皮性ナトリウムチャンネルが関与している可能性 (Vessey *et al.*, 2005) が報じられている。㊦～㊨の何れが真のメカニズムであるのかを解明するために、鋭意解析が進められており、pH 説は最も有力な仮説となっている。

GABA 説に関しては、下等脊椎動物では機能しているが、哺乳動物では機能しないと考えられてきた。ところが、最近キンギョ (*Carassius auratus*) のみならずマウス (*Mus musculus*) 網膜において水平細胞から視細胞への負のフィードバックに関与している可能性が報告された (Endeman *et al.*, 2012; Kemmler *et al.*, 2014)。さらに、水平細胞の GABA トランスポーターを欠損させたマウス (*Mus musculus*) 網膜において、水平細胞から視細胞への負のフィードバックの影響が減弱することが明らかになり、この負のフィードバックに水平細胞が放出する GABA が必要である可能性が浮上してきた (Hirano *et al.*, 2016)。何れの報告でも、負のフィードバックの時間経過が遅いため、GABA は神経伝達物質ではなく、神経修飾物質として機能している可能性が疑われる。一方、Liu *et al.* (2013) は錐体ではなく、水平細胞に発現する GABA レセプターに関して新たな発想を展開している。ラット (*Rattus norvegicus*) 網膜の水平細胞に発現する GABA<sub>A</sub> レセプターと連動するイオンチャンネルは  $Cl^-$  のみならず  $HCO_3^-$  も透過するため、水平細胞の脱分極に伴うイオンチャンネルの活性化によって細胞外の  $HCO_3^-$  が細胞内へと移動し、細胞外 pH 緩衝能 (重炭酸緩衝系) が減弱して細胞外  $H^+$  濃度を増加させる可能性がある。Liu *et al.* (2013) の研究は、水平細胞の放出する GABA が pH 説に寄与することを示唆している。

水平細胞から視細胞への負のフィードバックに関する 3 仮説の進捗を通覧すると、pH 説が有力であるものの、他の 2 仮説 (GABA 説とエファプス説) についても研究が継続している。本論文は脊椎動物網膜でエファプス伝達のみならず、ギャップ結合チャンネルを構成するヘミチャンネル (コネキシンタンパク質によって構成される半チャンネル) がエファプス伝達にどのように関わっているのかについても調査した。エファプス伝達にヘミチャンネルが関与することを示す間接的証拠は散見されるものの、直接的証拠は未だなく、今後ヘミチャンネルがエファプス伝達に関与していることを示すための新たな研究法 (解析方法) の開発が必須となっている。近年、感覚系、神経系や循環系でヘミチャンネルが物質通路の役割を担っていることが注目されており、網膜でもヘミチャンネルが物質通路としての機能しているのか否かについて調査する必要が生じてきた。

## 【引用文献】

- Anastassiou, C. A., Perin, R., Markram, H. and Koch, C. (2011), Ephaptic coupling of cortical Neurons, *Nature Neurosci.*, **14**: 217–223.
- Anastassiou, C. A., Montgomery, S. M., Barahona, M., Buzsáki, G. and Koch, C. (2010), The effect of spatially inhomogeneous extracellular electric fields on neurons, *J. Neurosci.*, **30**: 1925–1936.
- Arvanitaki, A. (1942), Effects evoked in an axon by the activity of a contiguous one, *J. Neurophysiol.*, **5**: 89–108.
- Ayoub, G. S., Korenbrot, J. and Copenhagen D. R. (1989), Release of endogenous glutamate from isolated cone photoreceptors of the lizard, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 10**: 47–57.
- Bao, L., Locovei, S. and Dahl, G. (2004), Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP, *FEBS Lett.*, **572**: 65–68.
- Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., Tiunova, A., Born, T. L., Usman, N., Staroverov, D., Lukyanov, S. and Panchin, Y. (2004), The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins, *Genomics*, **83**: 706–716.
- Barbe, M. T., Monyer, H. and Bruzzone, R. (2006), Cell-cell communication beyond connexins: The pannexin channels, *Physiology*, **21**: 103–114.
- Barnes, S. and Bui, Q. (1991), Modulation of calcium-activated chloride current via pH-induced changes of calcium channel properties in cone photoreceptors, *J. Neurosci.*, **11**: 4015–4023.
- Baylor, D. A. and Hodgkin, A. L. (1973), Detection and resolution of visual stimuli by turtle Photoreceptors, *J. Physiol.*, **234**: 163–198.
- Baylor, D. A., Fuortes, M. G. F. and O’Bryan, P. M. (1971), Receptive fields of cones in the retina of the turtle, *J. Physiol.*, **214**: 265–294.
- 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.
- Blot, A. and Barbour, B. (2014), Ultra-rapid axon-axon ephaptic inhibition of cerebellar Purkinje cells by the pinceau, *Nature Neurosci.*, **17**: 289–295.
- Bokil, H., Laaris, N., Blinder, K., Ennis, M. and Keller, A. (2001), Ephaptic interactions in the mammalian olfactory system, *J. Neurosci.*, **21**: RC173 (<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-j0004.2001>)
- Braet, K., Aspeslagh, S., Vandamme, W., Willecke, K., Martin, P. E., Evans, W. H. and Leybaert, L. (2003), Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells, *J. Cell. Physiol.*, **197**: 205–213.
- Brooks, C. M. and Eccles, J. C. (1947), Electrical hypothesis of central inhibition, *Nature*, **159**: 760–764.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L. and A. De Flora, A. (2001), Connexin 43 hemichannels mediate  $Ca^{2+}$ -regulated transmembrane  $NAD^+$  fluxes in intact cells, *FASEB J.*, **15**: 10–12.
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A. and Monyer, H. (2003), Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**: 13644–13649.
- 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.
- Byzov, A. L., Golubtsov, K. V. and Trifonov, J. A. (1977), The model of mechanism of feedback between horizontal cells and photoreceptors in vertebrate retina, In *Vertebrate Photoreception* (Eds. H. B. Barlow.

- and P. Fatt), pp. 265–274, Academic Press, London.
- Cadetti, L. and Thoreson, W. B. (2006), Feedback effects of horizontal cell membrane potential on cone calcium currents studied with simultaneous recordings, *J. Neurophysiol.*, **95**: 1992–1995.
- Cenedese, V., de Graaff, W., Csikós, T., Poovayya, M., Zoidl, G. and Kamermans, M. (2017), Pannexin 1 is critically involved in feedback from horizontal cells to cones, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**: 1–13 (<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00403>).
- Chan, C. Y. and Nicholson, C. (1986), Modulation by applied electric fields of Purkinje and stellate cell activity in the isolated turtle cerebellum, *J. Physiol.*, **371**: 89–114.
- Chan, C. Y., Hounsgaard, J. and Nicholson, C. (1988), Effects of electric fields on transmembrane potential and excitability of turtle cerebellar Purkinje cells in vitro, *J. Physiol.*, **402**: 751–771.
- Chebib, M. and Johnston, G. A. R. (1999), The ‘ABC’ of GABA receptors: A Brief review, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **26**: 937–940.
- Consortium, T. C. E. S. (1998), Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology, *Science*, **282**: 2012–2018.
- Contreras, J. E., Sáez, J. C., Bukauskas, F. F. and Bennett, M. V. (2003), Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**: 11388–11393.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536–539.
- Cotrina, M. L., Lin, J. H., López-García, J. C., Naus, C. C. and Nedergaard, M. (2000), ATP-mediated glia signaling, *J. Neurosci.*, **20**: 2835–2844.
- Country, M. (2017), Advancing the pH hypothesis of negative feedback to photoreceptors: Sources of protons and a role for bicarbonate in feedback, *J. Physiol.*, **595**: 1023–1024.
- Datta, A., Bansal, V., Diaz, J., Patel, J., Reato, D. and Bikson, M. (2009), Gyri-precise head model of transcranial direct current stimulation: improved spatial focality using a ring electrode versus conventional rectangular pad, *Brain Stimul.*, **2**: 201–207.
- Davenport, C. M., Detwiler, P. B. and Dacey, D. M. (2008), Effects of pH buffering on horizontal and ganglion cell light responses in primate retina: Evidence for the proton hypothesis of surround formation, *J. Neurosci.*, **28**: 456–464.
- Deans, M. R. and Paul, D. L. (2001), Mouse horizontal cells do not express connexin26 or connexin36, *Cell Commun. Adhes.*, **8**: 361–366.
- Deans, J. K., Powell, A. D. and Jefferys, J. G. (2007), Sensitivity of coherent oscillations in rat hippocampus to AC electric fields, *J. Physiol.*, **583**: 555–565.
- De Robertis, E. D. P. and Bennett, H. S. (1955), Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**: 47–58.
- DeVries, S. H. (2001), Exocytosed protons feedback to suppress the  $\text{Ca}^{2+}$  current in mammalian cone photoreceptors, *Neuron*, **32**: 1107–1117.
- DeVries, S. and Schwartz, E. (1992), Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina, *J. Physiol.*, **445**: 201–230.
- DeVries, S. H., Li, W. and Saszik, S. (2006), Parallel processing in two transmitter microenvironments at the cone photoreceptor synapse, *Neuron*, **50**: 735–748.
- Dmitriev, A. V. and Mangel, A. C. (2006), Electrical feedback in the cone pedicle: A computational analysis, *J. Neurophysiol.*, **95**: 1419–1427.
- Dowling, J. E. and Boycott, B. B. (1966), Organization of the primate retina: electron microscopy, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **166**: 80–111.
- Dowling, J. E. and Werblin, F. S. (1969), Organization of retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus* I. Synaptic structure, *J. Neurophysiol.*, **32**: 315–328.
- Du, J., Hossain, Z. and Mandal, J. (2017), Protons: A neurotransmitter in the brain, *Edorium J. Cell Biol.*, **3**: 1–3.
- Du, J., Reznikov, L. R., Price, M. P., Zha, X.-M., Lu, Y., Moninger, T. O., Wemmie, J. A. and Welsh, M. J. (2014), Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala, *Proc. Natl.*

- Acad. Sci., **11**: 8961–8966.
- Dudek, F. E., Yasumura, T. and Rash, J. E. (1998), Non-synaptic mechanisms in seizures and epileptogenesis, *Cell Biol. Int.*, **22**: 793–805.
- Ebihara, L. (1996), *Xenopus* connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes, *Biophys. J.*, **71**: 724–748.
- Ebihara, L. and Steiner, E. (1993), Properties of a nonjunctional current expressed from a rat connexin46 cDNA in *Xenopus* oocytes, *J. Gen. Physiol.*, **102**: 59–74.
- Ebihara, L. and Pal, J. (2000), Biophysical Properties of Hemi-gap-junctional Channels Expressed in *Xenopus* Oocytes, In *Gap junctions: Molecular basis of cell communication in health and disease* (Ed. C. Peracchia), pp. 357–367, Academic Press, London.
- Ebihara, L., Liu, X. and Pal, J. D. (2003), Effect of external magnesium and calcium on human connexin46 hemichannels, *Biophys. J.*, **84**: 277–286.
- Ebihara, L., Berthoud, V. M. and Beyer, E. C. (1995), Distinct behavior of connexin56 and connexin46 gap-junctional channels can be predicted from the behavior of their hemi-gap-junctional channels, *Biophys. J.*, **68**: 1796–1803.
- Eccles, J. C. (1946), An electrical hypothesis of synaptic and neuromuscular transmission, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **47**: 429–455.
- Eccles, J. C. (1948), Conduction and synaptic transmission in the nervous system, *Ann. Rev. Physiol.*, **10**: 93–116.
- Eccles, J. C. (1982), The synapse: From electrical to chemical transmission, *Ann. Rev. Neurosci.*, **5**: 325–339.
- Eccles, J. C., Katz, B. and Kuffler, S. W. (1941), Nature of the endplate potential in curarized muscle, *J. Neurophysiol.*, **4**: 362–387.
- Eliasof, S. and Werblin, F. (1993), Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander, *J. Neurosci.*, **113**: 402–411.
- Eliasof, S., Arriza, J. L., Leighton, B. H., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1998a), Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: Identification, localization, and function, *J. Neurosci.*, **18**: 698–712.
- Eliasof, S., Arriza, J. L., Leighton, B. H., Amara, S. G. and Kavanaugh, M. P. (1998b), Localization and function of five glutamate transporters cloned from the salamander retina, *Vision Res.*, **38**: 1443–1454.
- Endeman, D., Fahrenfort, I., Sjoerdsma, T., Steijaert, M., Ten Eikelder, H. and Kamermans, M. (2012), Chloride currents in cones modify feedback from horizontal cells to cones in goldfish retina, *J. Physiol.*, **590**: 5581–5595.
- Furshpan, E. J. (1964), Electrical transmission at an excitatory synapse in a vertebrate brain, *Science*, **144**: 878–880.
- Gerschenfeld, H. M., Piccolino, M. and Neyton, J. (1981), Feed-back modulation of cone synapses by L-horizontal cells of turtle retina, *J. Exp. Biol.*, **89**: 177–192.
- Ghai, R. S., Bikson, M. and Durand, D. M. (2000), Effects of applied electric fields on low calcium epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices, *J. Neurophysiol.*, **84**: 274–280.
- Gómez-Hernández, J. M., de Miguel, M., Larossa, B., González, D. and Barrio, L. C. (2003), Molecular basis of calcium regulation in connexin-32 hemichannels, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**: 16030–16035.
- Gupta, V. K., Berthoud, V. M., Atal, N., Jarillo, J. A., Barrio, L. C. and Beyer, L. C. (1994), Bovine connexin44, a lens gap junction protein: molecular cloning, immunological characterization, and functional expression, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **35**: 3747–3758.
- 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.
- Hartline, H. K. (1949), Inhibition of activity of visual receptors by illuminating nearby retinal areas in the *Limulus* eye, *Fed. Proc.*, **8**: 69.
- Hirano, A. A., Liu, X., Boulter, J., Grove, J., Pérez de Sevilla Müller, L., Barnes, S. and Brecha, N. C. (2016), Targeted deletion of vesicular GABA transporter from retinal horizontal cells eliminates feedback modulation of photoreceptor calcium channels, *eNeuro*, **3**: 1–13 (<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0148-15.2016>).

- Hirasawa, H. and Kaneko, A. (2003), pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating  $\text{Ca}^{2+}$  channels, *J. Gen. Physiol.*, **122**: 657–671.
- Hombach, S., Janssen-Bienhold, U., Sohl, G., Schubert, T., Bussow, H., Ott, T., Weiler, R. and Willecke, K. (2004), Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina, *Eur. J. Neurosci.*, **19**: 2633–2640.
- Hrg, D. (2013), Synchronization of two Hindmarsh-Rose neurons with unidirectional coupling, *Neural Networks*, **40**: 73–79.
- Ishida, A. T., Stell, W. T. and Lightfoot, D. O. (1980), Rod and cone inputs to bipolar cells in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **191**: 315–335.
- Jacoby, J., Kreitzer, M. A., Alford, S., Qian, H., Tchernookova, B. K., Naylor, E. R. and Malchow, R. P. (2012), Extracellular pH dynamics of retinal horizontal cells examined using electrochemical and fluorometric methods, *J. Neurophysiol.*, **107**: 868–879.
- Jefferys, J. G. and Haas, H. L. (1982), Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission, *Nature*, **300**: 448–450.
- John, S. A., Kondo, R., Wang, S.-Y., Goldhaber, J. I. and Weiss, J. N. (1999), Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition, *J. Biol. Chem.*, **274**: 236–240.
- Johnson, J., Chen, T. K., Rickman, D. W., Evans, C. and Brecha, N. C. (1996), Multiple  $\gamma$ -aminobutyric acid plasma membrane transporters GAT-1, GAT-2, GAT-3 in the rat retina, *J. Comp. Neurol.*, **375**: 212–224.
- Jouhou, H., Yamamoto, K., Homma, A., Hara, M., Kaneko, A. and Yamada, M. (2007), Depolarization of isolated horizontal cells of fish acidifies their immediate surrounding by activating V-ATPase, *J. Physiol.*, **585**: 401–412.
- Kaila, K., Pasternack, M., Saarikoski, J. and Voipio, J. (1989), Influence of GABA-gated bicarbonate conductance on potential, current and intracellular chloride in crayfish muscle fibres, *J. Physiol.*, **416**: 161–181.
- Kamermans, M., Fahrenfort, I., Schultz, K., Janssen-Bienhold, U., Sjoerdsma, T. and Weiler, R. (2001), Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina, *Science*, **292**: 1178–1180.
- Kaneko, A. (1973), Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina, *J. Physiol.*, **235**: 133–153.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1982), Retinal bipolar cells with double colour-opponent receptive field, *Nature*, **293**: 220–222.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1986), Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina, *J. Physiol.*, **373**: 443–461.
- Katz, B. and Miledi, R. (1965), The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **161**: 483–495.
- Katz, B. and Schmitt, O. H. (1940), Electric interaction between two adjacent nerve fibres, *J. Physiol.*, **97**: 471–488.
- Kawasaki, H., Eguchi, S., Miyashita, S., Chan, S., Hirai, K., Hobara, N., Yokomizo, A., Fujiwara, H., Zamami, Y., Koyama, T., Jin, X. and Kitamura, Y. (2009), Proton acts as a neurotransmitter for nicotine-induced adrenergic and calcitonin gene-related peptide-containing nerve-mediated vasodilation in the rat mesenteric artery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **330**: 745–755.
- Kemmler, R., Schultz, K., Dedek, K., Euler, T. and Schubert, T. (2014), Differential regulation of cone calcium signals by different horizontal cell feedback mechanisms in the mouse retina, *J. Neurosci.*, **34**: 11826–11843.
- Klaassen, L. J., Fahrenfort, I. and Kamermans, M. (2012), Connexin hemichannel mediated ephaptic inhibition in the retina, *Brain Res.*, **1487**: 25–38.
- Klaassen, L. J., Sun, Z., Steijaert, M. N., Bolte, P., Fahrenfort, I., Sjoerdsma, T., Klooster, J., Claassen, Y., Shields, C. R., Ten Eikelder, H. M., Janssen-Bienhold, U., Zoidl, G., McMahon, D. G. and Kamermans, M. (2011), Synaptic transmission from horizontal cells to cones is impaired by loss of connexin hemichannels, *PLoS Biol.*, **9**: 1–17 (<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001107>).
- Kolb H. (1970), Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **258**: 261–283.

- Kramer, R. H. and Davenport, C. M. (2015), Lateral inhibition in the vertebrate retina: The case of the missing neurotransmitter, *PloS Biol.*, **13**: 1–8 (<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002322>).
- Kranz, K., Dorgau, B., Pottek, M., Herrling, R., Schultz, K., Bolte, P., Monyer, H., Penuela, S., Laird, D. W., Dedek, K., Weiler, R. and Janssen-Bienhold, U. (2012), Expression of Pannexin1 in the outer plexiform layer of the mouse retina and physiological impact of its knock-out, *J. Comp. Neurol.*, **521**: 1119–1135.
- Kreitzer, M. A., Collis, L. P., Molina, A. J. A., Smith, P. J. S. and Malchow, R. P. (2007), Modulation of extracellular proton fluxes from retinal horizontal cells of the catfish by depolarization and glutamate, *J. Gen. Physiol.*, **130**: 169–182.
- Kuffler, S. W. (1948), Physiology of neuro-muscular junctions: electrical aspects, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **7**: 437–446.
- Kuffler, S. W. (1953), Discharge patterns and functional organization of mammalian retina, *J. Neurophysiol.*, **16**: 37–68.
- Kurtenbach, S., Prochnow, N., Kurtenbach, S., Klooster, J., Zoidl, C., Dermietzel, R., Kamermans, M. and Zoidl, G. (2013), Pannexin1 channel proteins in the zebrafish retina have shared and unique properties, *PloS One*, **8**: 1–19 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077722>).
- Lam, D. M.-K. (1972), The biosynthesis and content of gamma-aminobutyric acid in the goldfish retina, *J. Cell Biol.*, **54**: 225–231.
- Lam, D. M. K. (1975), Biosynthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid by isolated axons of cone horizontal cells in the goldfish retina, *Nature*, **254**: 345–347.
- Lam, D. M. K. and Steinman, L. (1971), The uptake of [ $\gamma$ - $^3$ H] aminobutyric acid in the goldfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**: 2777–2781.
- Lam, D. M. K., Lasater, E. M. and Naka, K.-I. (1978),  $\gamma$ -aminobutyric acid: A neurotransmitter candidate for cone horizontal cells of the catfish retina, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**: 6310–6313.
- Lam, D. M.-K., Su, T., Swain, L., Marc, R. E., Brandon, C. and Wu, J.-Y. (1979), Immunocytochemical localization of L-glutamic acid decarboxylase in the goldfish retina, *Nature*, **278**: 565–567.
- Lasansky, A. (1971), Synaptic organization of cone cells in the turtle retina, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **262**: 365–381.
- Lasansky, A. (1973), Organization of the outer synaptic layer in the retina of the larval tiger salamander, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **265**: 471–489.
- Lasansky, A. (1981), Synaptic action mediating cone responses to annular illumination in the retina of the larval tiger salamander, *J. Physiol.*, **310**: 205–214.
- Lasater, E. M. and Dowling, J. E. (1982), Carp horizontal cells in culture respond selectively to L-glutamate and its agonists, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**: 936–940.
- López-Munñz, F. and Alamo, C. (2009), Historical evolution of the neurotransmission concept, *J. Neural Transm.*, **116**: 515–533.
- Li, H., Liu, T.-F., Lazrak, A., Peracchia, C., Goldberg, G. S., Lampe, P. D. and Johnson, R. G. (1996), Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells, *J. Cell Biol.*, **134**: 1019–1030.
- Lin, J. and Keener, J. P. (2010), Modeling electrical activity of myocardial cells incorporating the effects of ephaptic coupling, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**: 20935–20940.
- Liu, X., Hirano, A. A., Sun, X., Brecha, N. C. and Barnes, S. (2013), Calcium channels in rat horizontal cells regulate feedback inhibition of photoreceptors through an unconventional GABA- and pH-sensitive mechanism, *J. Physiol.*, **591**: 3309–3324.
- Locovei, S., Wang and J., Dahl, G. (2006), Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium, *FEBS Lett.*, **580**: 239–244.
- MacVicar, B. A. and Thompson, R. J. (2010), Non-junction functions of pannexin-1 channels, *Trends Neurosci.*, **33**: 93–102.
- Marc, R. E., Stell, W. K., Bok, D. and Lam, D. M. K. (1978), GABA-ergic pathway in the goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **182**: 221–245.
- Meş̇e, G., Richard, G. and White, T. W. (2007), Gap junctions: basic structure and function, *J. Invest. Derma-*

- tol., **127**: 2516–2524.
- Miller, A. M. and Schwartz, E. A. (1983), Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina, *J. Physiol.*, **334**: 325–349.
- Missotten, L. (1965), The ultrastructure of the human retina, Arscia Uitgaven N. V., Brussels.
- Molina, A. J. A., Verzi, M. P., Birnbaum, M. A., Kreitzer, M. A., Yamoah, E. N., Hammer, K., Smith, P. J. S. and Malchow, R. P. (2004), Neurotransmitter modulation of extracellular pH fluxes from retinal horizontal cells, *J. Physiol.*, **560**: 639–657.
- 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., Ohtsuka, T. and Shimazaki, H. (1975), Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina, *Vision Res.*, **15**: 456–458.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982a), GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina, *Jpn J. Physiol.*, **32**: 911–926.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982b), GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina, *Jpn. J. Physiol.*, **32**: 927–935.
- Noebels, J. L. and Prince, D. A. (1978), Development of focal seizures in cerebral cortex: Role of axon terminal bursting, *J. Neurophysiol.*, **41**: 1267–1281.
- O'Bryan, P. M. (1973), Properties of the depolarizing synaptic potential evoked by peripheral illumination in cones of the turtle retina, *J. Physiol.*, **235**: 207–22.
- Orellana, J. A., Díaz, E., Schalper, K. A., Vargas, A. A., Bennett, M. V. and Sáez, J. C. (2011), Cation permeation through connexin43 hemichannels is cooperative, competitive and saturable with parameters depending on the permeant species, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **409**: 603–609.
- Ozen, S., Sirota, A., Belluscio, M. A., Anastassiou, C. A., Stark, E., Koch, C. and Buzsáki, G. (2010), Transcranial electric stimulation entrains cortical neuronal populations in rats, *J. Neurosci.*, **30**: 11476–11485.
- Palade, G. E. and Palay, S. L. (1954), Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses, *Anat. Rec.*, **118**: 335–336.
- Panchin, Y. V. (2005), Evolution of gap junction proteins – the pannexin alternative, *J. Exp. Biol.*, **208**: 1415–1419.
- Paul, D. L., Ebihara, L., Takemoto, L. J., Swenson, K. I. 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.
- Phelan, P. and Starich, T. A. (2001), Innexins get into the Gap, *Bioessays*, **23**: 388–396.
- Picaud, S., Karsson, H. P., Grant, G. B. and Werblin, F. S. (1995a), Glutamate-gated chloride channel with glutamate-transporter-like properties in cone photoreceptors of the tiger salamander, *J. Neurophysiol.*, **74**: 1760–1771.
- Picaud, S., Karsson, H. P., Wellis, D. P., Lecar, H. and Werblin, F. S. (1995b), Cone photoreceptors respond to their own glutamate release in the tiger salamander, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**: 9417–9421.
- 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.
- Prochnow, N., Hoffmann, S., Vroman, R., Klooster, J., Bunse, S., Kamermans, M., Dermietzel, R. and Zoidl, G. (2009), Pannexin1 in the outer retina of the zebrafish, *Danio rerio*, *Neuroscience*, **162**: 1039–1054.
- Quist, A. P., Rhee, S. K., Lin, H. and Lal, R. (2000), Physiological role of gap-junctional hemichannels: Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation, *J. Cell Biol.*, **148**: 1063–1074.
- Radman, T., Su, Y., An, J. H., Parra, L. C. and Bikson, M. (2007), Spike timing amplifies the effect of electric fields on neurons: implications for endogenous field effects, *J. Neurosci.*, **27**: 3030–3036.
- Ripps, H., Qian, H. and Zakevicius, J. (2004), Properties of connexin26 hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes, *Cell Mol. Neurosci.*, **24**: 647–665.
- 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.
- Roth, B. J. (2014), Does ephaptic coupling contribute to propagation in cardiac tissue?, *Biophys. J.*, **106**:

774–775.

- Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilo, D., Bukauskas, F. F. and Bennett, M. V. L. (2005), Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1711**: 215–224.
- Sáez, J. C., Berthoud, V. M., Brañes, M. C., Martínez, A. D. and Beyer, E. C. (2003), Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions, *Physiol. Rev.*, **83**: 1359–1400.
- Saito, T. (1987), Physiological and morphological differences between on- and off-center bipolar cells in the vertebrate retina, *Vision Res.*, **27**: 135–142.
- Sánchez, H. A., Mese, G., Srinivas, M., White, T. W. and Verselis, V. K. (2010), Differentially altered  $\text{Ca}^{2+}$  regulation and  $\text{Ca}^{2+}$  permeability in Cx26 hemichannels formed by the A40V and G45E mutations that cause keratitis ichthyosis deafness syndrome, *J. Gen. Physiol.*, **136**: 47–62.
- Sasaki, T. and Kaneko, A. (1996), L-glutamate-induced responses in Off-type bipolar cells of the cat retina, *Vision Res.*, **36**: 787–795.
- Scemes, E., Spray, D. C. and Meda, P. (2009), Connexins, pannexins, innexins: novel roles of hemi-Channels, *Pflügers Arch.*, **457**: 1207–1226.
- Schmitz, Y. and Witkovsky, P. (1996), Glutamate release by the intact light-responsive photoreceptor layer of the *Xenopus* retina, *J. Neurosci. Meth.*, **68**: 55–60.
- Schmitz, Y. and Witkovsky, P. (1997), Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel, *Neurosci.*, **78**: 1209–1216.
- Schwartz, E. A. (1982), Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina, *J. Physiol.*, **323**: 211–227.
- Schwartz, E. A. (1987), Depolarization without calcium can release  $\gamma$ -aminobutyric acid from a retinal neuron, *Science*, **238**: 350–355.
- Schwartz, E. A. (2002), Transport-mediated synapses in the retina, *Physiol. Rev.*, **82**: 875–891.
- Shad, K. F. and Barry, P. H. (1993), Anion permeation in GABA- and glycine-gated channels of mammalian cultured hippocampal neurons, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **253**: 69–75.
- Siegel, E. and Steinmann, M. E. (2012), Structure, function, and modulation of GABA<sub>A</sub> receptors, *J. Biol. Chem.*, **287**: 40224–40231.
- Slaughter, M. M. and Miller R. F. (1981), 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retinal research, *Science*, **211**: 182–185.
- Sosinsky, G. E., Boassa, D., Dermietzel, R., Duffy, H. S., Laird, D. W., MacVicar, B., Naus, C. C., Penuela, S., Scemes, E., Spray, D. C., Thompson, R. J., Zhao, H.-B. and Dahl, G. (2011), Pannexin channels are not gap junction hemichannels, *Channels*, **5**: 193–197.
- Sperelakis, N. and Mann, J. E. Jr. (1977), Evaluation of electric field changes in the cleft between excitable cells, *J. Theor. Biol.*, **64**: 71–96.
- Sperelakis, N. and McConnell, K. (2002), Electric field interactions between closely abutting excitable cells, *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, **21**: 77–89.
- Stacey, R. G., Hilbert, L. and Quail, T. (2015), Computational study of synchrony in fields and microclusters of ephaptically coupled neurons, *J. Neurophysiol.*, **113**: 3229–3241.
- Starich, T. A. (1996), eat-5 and unc-7 represent a multigene family in *Caenorhabditis elegans* involved in cell-cell coupling, *J. Cell Biol.*, **134**: 537–548.
- Stell, W. K. (1965), Correlation of retinal cytoarchitecture and ultrastructure in Golgi preparations, *Anat. Record.*, **153**: 389–397.
- Stell, W. K. and Lightfoot, D. O. (1975), Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish, *J. Comp. Neurol.*, **159**: 473–502.
- Stell, W. K., 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.
- Su, C.-Y., Menuz, K., Reisert, J. and Carlson, J. R. (2012), Non-synaptic inhibition between grouped neurons in an olfactory circuit, *Nature*, **492**: 66–71.
- Szmajda, B. A. and DeVries, S. H. (2011), Glutamate spillover between mammalian cone photoreceptors, *J. Neurosci.*, **31**: 13431–13441.

- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol.*, **321**: 141–161.
- Tachibana, M. and Kaneko, A. (1988), L-Glutamate-induced depolarization in solitary photoreceptors: a process that may contribute to the interaction between photoreceptors *In situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 5315–5319.
- Thoresen, W. B. and Bryson, E. J. (2004), Chloride equilibrium potential in salamander cones, *BMC Neurosci.*, **5**: 1–7 (<https://doi.org/10.1186/1471-2202-5-53>).
- Thoreson, W. B. and Burkhardt, D. A. (1990), Effects of synaptic clocking agents on the Depolarizing responses of turtle cones evoked by surround illumination, *Vis. Neurosci.*, **5**: 571–583.
- Thoreson, W. B. and Burkhardt, D. A. (1991), Ionic influences on the prolonged depolarization of turtle cones *in situ*, *J. Neurophysiol.*, **65**: 96–110.
- 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.
- Valiunas, V. (2013), Cyclic nucleotide permeability through unopposed connexin hemichannels, *Front. Pharmacol.*, **4**: 1–12 (<https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00075>).
- Valiunas, V. and Weingart, R. (2000), Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells, *Pflügers Arch.*, **440**: 366–379.
- Veeraraghavan, R., Gourdie, R. G. and Poelzing, S. (2014), Mechanisms of cardiac conduction: a history of revisions, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **306**: H619–H627.
- Verweij, J., Kamermans, M. and Sperkrijse, H. (1996), Horizontal cells feedback to cones by shifting the cone calcium-current activation range, *Vision Res.*, **36**: 3943–3953.
- Verweij, J., Hornstein, E. P. and Schnapf, J. L. (2003), Surround antagonism in macaque cone photoreceptors, *J. Neurosci.*, **23**: 10249–10257.
- Vessey, J. P., Lalonde, M. R., Mizan, H. A., Welch, N. C., Kelly, M. E. M. and Barnes, S. (2004), Carbenoxolone inhibition of voltage-gated Ca channels and synaptic transmission in the retina, *J. Neurophysiol.*, **92**: 1252–1256.
- Vessey, J. A., Stratis, A. K., Daniels, B. A., Silva, N. D., Jonz, M. G., Lalonde, M. R., Baldrige, W. H. and Barnes, S. (2005), Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone photoreceptor synapse, *J. Neurosci.*, **25**: 4108–4117.
- Villa, P., Kurahashi, T. and Kaneko, A. (1995), L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat, *J. Neurosci.*, **15**: 3571–3582.
- Vroman, R., Klaassen, L. J., Howlett, M. H. C., Cenedese, V., Klooster, J., Sjoerdsma, T. and Kamermans, M. (2014), Extracellular ATP hydrolysis inhibits synaptic transmission by increasing pH buffering in the synaptic cleft, *PLoS Biol.*, **12**: 1–17 (<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001864>).
- Warren, T. J., Van Hook, M. J., Supuran, C. T. and Thoreson, W. B. (2016a), Sources of protons and a role for bicarbonate in inhibitory feedback from horizontal cells to cones in *Ambystoma tigrinum* retina, *J. Physiol.*, **594**: 6661–6677.
- Warren, T. J., Van Hook, M. J., Tranchina, D. and Thoreson, W. B. (2016b), Kinetics of inhibitory feedback from horizontal cells to photoreceptors: implications for an ephaptic mechanism, *J. Neurosci.*, **36**: 10075–10088.
- Weiss, S. A., Preuss, T. and Faber, D. S. (2008), A role of electrical inhibition in sensorimotor integration, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**: 18047–18052.
- Werblin, F. S. and Dowling, J. E. (1969), Organization of the retina the the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording, *J. Neurophysiol.*, **32**: 339–355.
- Yang, J.-H. and Wu, S. M. (1997), Characterization of glutamate transporter function in the tiger salamander retina, *Vision Res.*, **37**: 827–838.
- Yazulla, S. and Studholme, K. M. (1997), Light adaptation affects synaptic vesicle density but not the distribution of GABA<sub>A</sub> receptors in goldfish photoreceptor terminals, *Microsc. Res. Tech.*, **36**: 43–56.
- Ye, Z. C., Wyeth, M. S., Baltan-Tekkok, S. and Ransom, B. R. (2003), Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release, *J. Neurosci.*, **23**: 3588–3596.

- Zampighi, G. A., Loo, D. D. F., Kreman, M., Eskandari, S. and Wright, E. M. (1999), Functional and morphological correlates of connexin50 expressed in *Xenopus Laevis* oocytes, *J. Gen. Physiol.*, **113**: 507–524.
- Zhang, D. Q. and McMahon, D. G. (2001), Gating of retinal horizontal cell hemi gap junction channels by voltage,  $\text{Ca}^{2+}$ , and retinoic acid, *Mol. Vis.*, **7**: 247–252.
- Zoidl, G., Bruzzone, R., Weickert, S., Kremer, M., Zoidl, C., Mitropoulou, G., Srinivas, M., Spray, D. C. and Dermietze, R. (2004), Molecular cloning and functional expression of zfCx52.6: A novel connexin with hemichannel forming properties expressed in horizontal cells of the zebrafish retina, *J. Biol. Chem.*, **279**: 2913–2921.
- Zonta, F., Polles, G., Zanotti, G. and Mammano, F. (2012), Permeation pathway of homomeric connexin 26 and connexin 30 channels investigated by molecular dynamics, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **29**: 985–998.

### 【参 考 文 献】

- Ampère, A.-M. (1821), Mémoires sur l'action mutuelle de deux courans électriques, Paris, Impr. de Feugery.
- Dale, H. H. (1914), The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **6**: 147–190.
- Du Bois-Reymond, E. (1848), Untersuchungen über Thierische Elektrizität Erster Band, Georg Reimer, Berlin.
- Du Bois-Reymond, E. (1849), Untersuchungen über Thierische Elektrizität Zweiter Band, Erste Abtheilung, Georg Reimer, Berlin.
- Du Bois-Reymond, E. (1877), Gesammelte Abhandlungen zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysik Zweiter Band, Verlag von Veit & Comp., Leipzig.
- Du Fay, F. R. S. (1733–1734), A Letter from Mons. Du Fay, F. R. S. and of the Royal Academy of Sciences at Paris, to his grace Charles Duke of Richmond and Lenox, concerning electricity (Translated from the French by T. S. M. D.), *Philos. Trans. R. Soc.*, **38**: 258–266.
- Franklin, B. (1751), Experiments and observations on electricity made at Philadelphia in America, London, E. Cave, at St. John's Gate.
- Foster, M. (1897), A text-book of physiology, MacMillan and Co., Ltd., New York.
- Galvani, L. (1791), De viribus electricitatis in motu musculari Commentarius, De Bononiensi Scientiarum et Artium Instituto atque Academia Commentarii, **7**: 363–418.
- Kühne, W. (1888), Croonian Lecture: On the Origin and the Causation of Vital Movement (Ueber die Entstehung der vitalen Bewegung), *Proc. R. Soc. Lond. B.* **44**: 427–448.
- Loewi, O. (1921), Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **189**: 239–242.
- Sørensen, S. P. L. (1909), Über die Messung und die Bedeutung der asserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen, *Biochem. Zeitschr.*, **21**: 131–304.
- Thomson, J. J. (1897), Cathode rays, *Philos. Mag.*, **44**: 293–316.
- Volta, A. (1793), Account of some discoveries made by Mr. Galvani from Mr. Alexander Volta to Mr. Tiberius Cavallo (in French), *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **83**: 10–44.
- Wells, A. D. (1857), The science of common things: A familiar explanation of the first principles of physical science for schools, families, and young students, Ivison, Blakeman, Taylor & Co., New York.

### 【注】

- 1) 脊椎動物網膜の視細胞（錐体と桿体）は、暗時に神経伝達物質としてL-Glutamateを放出している（Miller & Schwartz, 1983; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Schmitz & Witkovsky, 1996, 1997）。不思議なことに、第2次神経細胞であるOFF型双極細胞には過分極性光応答そしてON型双極細胞には脱分極性光応答が現れる。現在、両双極細胞に発生する正反対の膜電位変化の原因として、両双極細胞に発現するグルタミン酸レセプターが異なることが明らかになっている（例えば、Villa *et al.*, 1995;

Sasaki & Kaneko, 1996)。OFF 型双極細胞には Kainic acid/(RS)- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (KA/AMPA) 型グルタミン酸レセプター (イオンチャンネル直結型グルタミン酸レセプター) (例えば, Murakami *et al.*, 1975; Sasaki & Kaneko, 1996), そして ON 型双極細胞には 2-Amino-4-phosphonobutyric acid (APB) 感受性グルタミン酸レセプター (代謝調節型グルタミン酸レセプター) が発現している (例えば, Slaughter & Miller, 1981; Villa *et al.*, 1995)。OFF 型双極細胞に発現する KA/AMPA 型グルタミン酸レセプターに L-Glutamate が結合すれば, イオンチャンネルが開口して脱分極, また ON 型双極細胞に発現する APB 型グルタミン酸レセプターにグルタミン酸が結合すれば, イオンチャンネルが閉塞して過分極する。

- 2) 活動電位がシナプス前神経細胞のシナプス終末に到達すると, 電位依存性カルシウムチャンネルが活性化し, このチャンネルを通じて  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞外からシナプス終末内 (細胞内) に入る。シナプス終末内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇に伴いシナプス小胞は細胞膜へと移動し, 細胞膜と融合してシナプス小胞内の神経伝達物質をシナプス間隙に放出する。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シナプス下膜に発現するシナプスレセプターに結合する。この結果, このレセプターと連動するイオンチャンネルが活性化し, シナプス後神経細胞に膜電位変化が生じる。このように, 神経伝達物質が神経細胞間を移動することによってシナプス前神経細胞の膜電位変化をシナプス後神経細胞に伝播することを興奮の伝達と呼ぶ。興奮の伝達は, 興奮性シナプスあるいは抑制性シナプスを介するかによってシナプス後神経細胞に惹起される膜電位変化が正反対となる。現在, 神経伝達物質には数十種類以上が知られており, 興奮性シナプスと抑制シナプスでは神経伝達物質に違いが認められる。興奮性シナプスでは神経伝達物質として Acetylcholine (アセチルコリン) や L-Glutamate などが放出され, シナプス後神経細胞に脱分極を発生する。この脱分極を興奮性シナプス電位ともいう。また, 抑制性シナプスでは神経伝達物質として GABA や Glycine (グリシン) などが放出され, シナプス後神経細胞に過分極を発生する。これを抑制性シナプス電位ともいう。近年, シナプスレセプター研究の進展により, 単一神経伝達物質に対して複数のシナプスレセプタータイプが存在することが判明し, 神経伝達物質の違いに基づいて興奮性シナプスと抑制性シナプスを判別することが困難になっている。このため, 判別にはシナプス後神経細胞にどのような膜電位変化が現れるのかを調査する必要がある。例えば, Acetylcholine がニコチン性アセチルコリンレセプターに結合するとシナプス後神経細胞には脱分極が, ムスカリン性アセチルコリンレセプターに結合すると過分極が現れる。
- 3) Du Bois-Reymond (1848, 1849) は高感度の検流計を作製し, 神経や筋肉に発生する微弱な電流変化を導出することに成功した。これ以降の研究成果も踏まえ, Du Bois-Reymond (1877) は神経細胞の興奮によって軸索終末に流れる電流が, この神経が駆動する筋肉にも流れると考えた (第3図参照) (つまり, 神経細胞の軸索終末部には細胞膜を貫いて細胞内外を流れる電流が存在し, この電流が筋肉の細胞膜を貫いて流れることによって筋収縮を引き起こす。一方で, Du Bois-Reymond は神経が筋収縮を引き起こすしくみに化学物質が関与していることも予見していた)。Du Bois-Reymond (1877) による考え方は神経同士あるいは神経と筋肉が電氣的に繋がっているという仮説へと発展した。Katz & Schmitt (1940) は興奮した神経線維周辺に形成される局所的な電流回路が非興奮の神経線維を興奮に導くほど充分でないことを見出した。この研究の中で, 非興奮状態の神経線維を興奮させるには神経線維が接触する部分の電気抵抗が高いことが必要であり, これを達成するため神経線維の周辺を鉱物油で覆い実験を行った。その後, Arvanitaki (1942) は神経線維同士が近接して存在する状態にエファプス (エファプスはギリシャ語で接触を意味する。) という名称を与えた。Arvanitaki (1942) も神経線維を灌流するリンガー液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を調整することによって, 神経線維間の電気抵抗を上昇させる (あるいは, 近接して存在する神経線維の興奮性を上げる。) 条件下で実験を行った。爾来, 数多くのエファプス伝達に関する実験が行われてきたが, 未だ充分な確証を得るには至っていない。

神経線維が近接して存在する状態をエファプス (Ephapse) と呼び, エファプスを介した神経線維間の興奮伝播をエファプス結合 (Ephaptic coupling) (エファプス連絡 [Ephaptic communication] あるいはエファプス伝達 [Ephaptic transmission] ともいう。) と呼ぶ。エファプス結合は電気シナプスまたは化学シナプスを介する神経細胞間あるいは筋肉細胞間の直接的接続とは異なり, 神経線維の興奮伝導によって生じる細胞外の電位変化を利用した神経細胞 (神経線維や樹状突起) 間の間接的接続を指す (エファプス結合は近接するあるいは接触する細胞間のイオン交換によって生じる神経線維間接続を意味することもある)。近年, 神経機能にエファプス結合が関与する研究が報じられ, 再びシナプスを介さない情報伝播が注目を集めている。(例えば, Anastassiou *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2012)。実際, エファプ

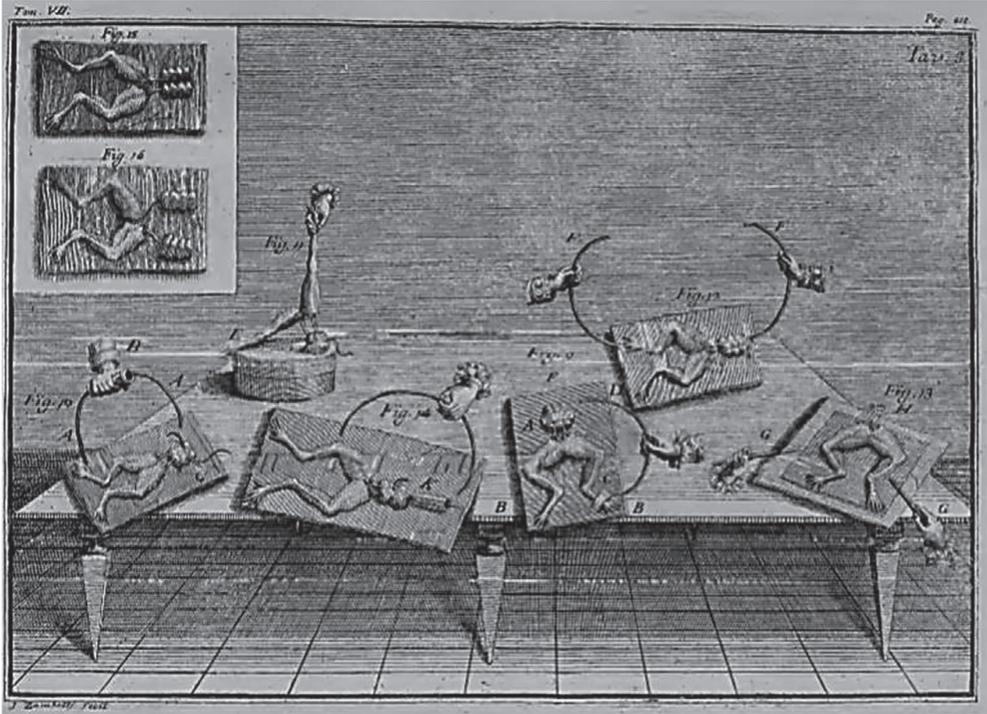
ス結合が神経細胞における活動電位発火の同期あるいはタイミングに影響する可能性があること、あるいは髄鞘形成がエファプス結合による相互作用を阻害することなどが知られている（例えば、Dudek *et al.*, 1998; Radman *et al.*, 2007; Anastassiou *et al.*, 2010; Hrg, 2013）。しかし、エファプス伝達の詳細なメカニズムが解明されたわけではない。当然、エファプス伝達に懐疑的な研究者も多く、その一人である Roth (2014) は *Biophysical Journal* に投稿した News & Notable（注目すべきニュース）の中で、「The agreement between their simulations and Poelzing's data is impressive, but I will need a more definitive experimental confirmation before I can embrace the ephaptic hypothesis. (Poelzing 一派の研究グループのよって報告されたシミュレーションと実験データとの一致はとても印象的であるが、私がエファプス説を受け入れるには疑いようのない証拠 [科学的根拠] を示す実験を行うことが必要であろう。)」と述べている。

- 4) Du Fay (1733) は摩擦電気の研究を行い、互いに反発する電気と引き合う電気の2種類が存在することを見出した。これらにガラス電気（ガラス棒はプラス [正] に帯電する。）および樹脂電気（エボナイト棒はマイナス [負] に帯電する。）という名称を与えた。Franklin (1751) は、Du Fay (1733) の主張したガラス電気と樹脂電気を再現し、これらの電気を重ね合わせることで帯電がなくなることを見出した。この理由として、一方は電気が過剰状態そして他方は電気が不足状態にあると考えた。この実験を踏まえ、電気は1種類であることを主張し、過剰をプラス電気（あるいは陽電気）そして不足をマイナス電気（あるいは陰電気）と呼んだ。また、Franklin (1751) は Ampère (1821) が提案したように、電気はプラスからマイナスに流れると考えていたようである。約100年後、Thomson (1897) は陰極線の特性を調べる過程で、マイナスに帯電した粒子、すなわち電子（自由電子）を発見した。この時点で、漸く電流（電気の流れを指す。）の正体が電子であることが判明し、電気はマイナスからプラスに流れることが突き止められた。電流とは電子の流れを指すが、不思議なことに、今でも電流はプラスからマイナスに流れるという慣例が使われている。ただし、電解質（例えば、塩化ナトリウム [NaCl] や塩化カリウム [KCl] を指す。）を溶かした溶液中の電流の正体は、プラス電荷を持った陽イオン（例えば、 $\text{Na}^+$  や  $\text{K}^+$  を指す）とマイナス電荷を持った陰イオン（例えば、 $\text{Cl}^-$  を指す。）の両方である。上述のように、電流の流れはプラスからマイナスと決められているので、プラス電荷を持つイオンがA地点からB地点に移動すれば、電流はA地点からB地点に流れる。しかし、マイナス電荷を持つイオンがA地点からB地点に移動すれば、電流はB地点からA地点に流れる。

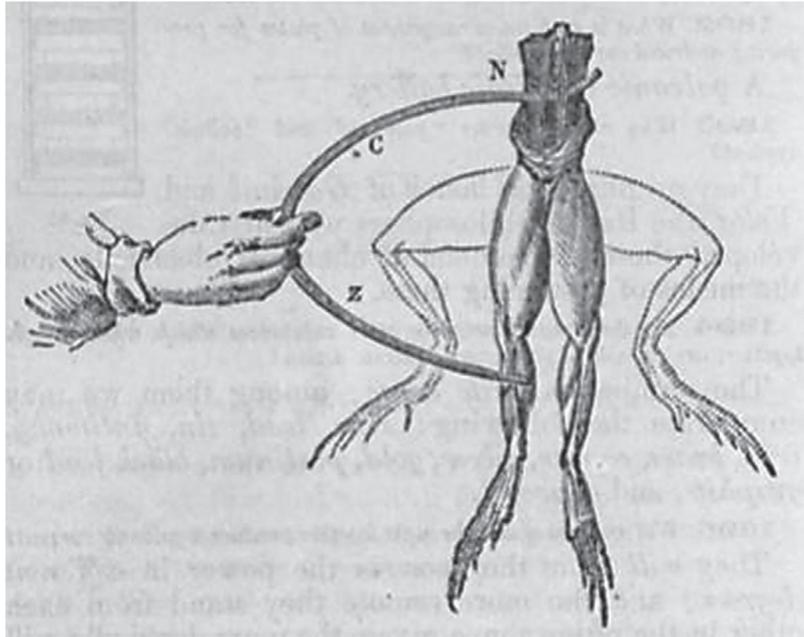
18世紀半ばにライデン瓶が発明されると、電気は身近にある力（あるいはエネルギー）として一般に受け入れられるようになった。Galvani (1791) はカエル神経筋標本を用いて実験を行い、運動神経に蓄えられた帯電流動体（実体は不明であり、電気を帯びた流動体をイメージしていたと思われる。）が、神経と筋肉の間を金属ピンセットで接続させることによって筋肉内に移動し収縮すると考えていた。Galvani は神経が電気を蓄えることは、摩擦起電機を使ってライデン瓶に静電気を蓄えることと同じであると推測していた。その後、Du Bois-Reymond (1848, 1848) が高感度検流計の作製し、電気生理学の基礎を確立した。1860年頃、Kühne は Galvani の考え方をまとめ、「神経のみが電流の作用によって筋肉を収縮させることができる。」とする仮説へと発展させた（Kühne, 1888）。この仮説は Du Bois-Reymond (1877) によって疑問（当時、Du Bois-Reymond は神経による筋肉の収縮に、化学物質も関与していることを想定していた。）が提起されたにもかかわらず、長い間生き続けた。興奮する神経細胞（あるいは神経線維）から筋肉あるいは非興奮の神経細胞（あるいは神経線維）に興奮が伝播するメカニズムとして局所電流が流れるというシナプス（エファプスも含む。）の考え方はニューロン説が確定しない状況下で至極当然であった。Dale (1914) が神経伝達物質としてアセチルコリンを同定、さらに Loewi (1921) が神経系における神経伝達物質の重要性を指摘し、化学物質を介したシナプス伝達がほぼ確実となった。にもかかわらず、Eccles の研究グループはシナプス伝達が電氣的である可能性を主張した（Eccles *et al.*, 1942; Eccles, 1946; Brooks & Eccles, 1947）（とはいえ、Eccles [1948] はシナプスが化学的であることに同意していた。）。後年、シナプス伝達はその殆どが化学的であり、一部は電氣的なものであることが判明した（例えば、Eccles, 1982）。他方、Katz & Schmitt (1940) および Arvanitaki (1942) は生理的条件下でエファプス伝達が生じる可能性が低いことを示唆した。

神経生理学分野では細胞膜に発現するイオンチャネルを通じてイオンが細胞内外を移動するとき、プラスイオンが細胞内から細胞外へ出るあるいはマイナスイオンが細胞外から細胞内に入る場合を外向き電流、反対にプラスイオンが細胞外から細胞内に入るあるいはマイナスイオンが細胞内から細胞外へ出る場合を内向き電流と呼んでいる。

A



B



- 5) Byzov の研究グループは、錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙とシナプス外（シナプス下膜付近のシナプス間隙から離れた細胞外部を指す。）の間に局所回路が形成され、水平細胞に惹起される膜電流が局所回路を流れる際、シナプス間隙（シナプス下膜付近の細胞間隙）に電位差が現れることを想定した。暗時、錐体から放出される L-Glutamate は錐体水平細胞にグルタミン酸電流を惹起し、この細胞を脱分極に導く。暗時が継続すれば、錐体水平細胞は脱分極を経て定常状態となる。定常状態の水平細胞（暗時）の膜電位は約  $-30\text{ mV}$  であり、グルタミン酸電流の逆転電位 ( $-10\text{ mV} \sim 0\text{ mV}$ ) に近いので、グルタミン酸電流は減弱する。中心受容野を暗黒、周辺受容野を光照射するドーナツ状光刺激を与えると、周辺受容野の錐体は過分極する。このため、錐体は L-Glutamate の放出を減じ、錐体水平細胞には過分極が生じる。この過分極は水平細胞間を繋ぐ電気シナプス（ギャップ結合）を介して近隣の錐体水平細胞へと伝播する。当然、暗黒に保たれた中心受容野の錐体は L-Glutamate 放出を維持しているが、電気シナプスを介して繋がっている周辺受容野からの影響（過分極）を受け、錐体水平細胞は膜電位を脱分極状態（あるいは定常状態）を維持することが困難となる（周辺受容野への光照射に伴う過分極が電気シナプスを介して伝播するため、錐体水平細胞の脱分極 [あるいは定常状態] は相殺され、膜電位は過分極側にシフトする。）。つまり、周辺受容野への光照射によって中心受容野の錐体水平細胞は過分極するため、暗黒状態の錐体水平細胞よりもグルタミン酸電流は増加し、錐体シナプス終末陥入部内シナプス間隙とシナプス外によって形成される局所回路を流れる電流が増す。この結果、シナプス間隙はマイナスに移行して錐体シナプス終末を脱分極させ、電位依存性カルシウムチャネルを活性化させる。このため、周辺受容野への光照射は、暗黒よりも錐体から放出される L-Glutamate 量を増す。このようにして、Byzov の研究グループは錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックが化学シナプスや電気シナプスでなく、シナプス間隙部の局所回路を流れる細胞外電流（現在、エファプス伝達と呼んでいる。）によって達成されたと考えた。
- 6) 錐体シナプス終末には電位依存性カルシウムチャネル（正確には、L型カルシウムチャネルである。）が発現し、L-Glutamate 放出に必要なカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) を供給している。錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックに関して現在3仮説が議論されているが、何れの仮説にも錐体の電位依存性カルシウムチャネル活性が関与している。GABA 説では、水平細胞から放出される GABA が錐体シナプス終末に発現する  $\text{GABA}_A$  レセプターに結合し、シナプス終末を過分極させることで、電位依存性カルシウムチャネル活性を低下させる。エファプス説では、錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙を流れる電流が細胞外をマイナスに導き（このマイナスは錐体シナプス終末の脱分極と等価と考えられる。）、電位依存性カルシウムチャネル活性を低下させる。そして、pH 説では、細胞外の  $\text{H}^+$  濃度の減少が電位依

#### 第5図：Galvani のカエル神経筋標本と筋収縮

A : Galvani (1791) はカエルの神経筋標本を作製し、この標本の脊柱に銅製フックを通し、鉄製柵に吊るした。屋外に置いた標本は、稲妻が走ると痙攣（筋肉の急激な収縮）した。また、標本の客が鉄製柵に触れると痙攣した。これらの発見を調査するため、板状の銅片と亜鉛片を組み合わせた金属弓（銅と亜鉛のように2種類の金属薄片をピンセット状にした簡易器具を指し、電気ピンセットともいう。）を作製し、この一方を神経（脚を支配する坐骨神経）そして他方を筋肉に接触させた。この図は Galvani (1791) 著『De viribus electricitatis in motu musculari Commentarius』に掲載された図を Smithsonian Libraries (<https://archive.org/details/AloysiiGalvaniD00Galv>) からコピーし作製した。左上には神経筋標本、中央には実験机上に複数の神経筋標本と金属弓が描かれている。B : Wells (1857) の著書『The science of common things: A familiar explanation of the first principles of physical science for schools, families, and young students』の中に、Galvani の研究が図入りで紹介されている。この図は Wells (1857) の著書に掲載された図を Biodiversity Heritage Library (<https://www.biodiversitylibrary.org/item/70458#page/5/mode/1up>) からコピーし作製した。金属弓の銅片 (C) を坐骨神経束 (N) の下に置き、亜鉛片 (Z) は腓腹筋に接触させている。神経あるいは筋肉の何れにも金属弓を接触させなければ、収縮は見られない。しかし、金属弓の両端を神経と筋肉に接触させると、B に描かれているように筋収縮が生じる。このような Galvani の実験を踏まえ、Wells は Galvani の実験に関する説明の最後に「Here, then, we have distinct evidence of the presence of free electricity, developed apparently by simple contact. (これらを踏まえ、ここに、Galvani の実験（神経と筋の金属弓による単純な接続）によって自由に移動することができる電気の存在を私たちは目の当たりにすることができる。）」と締め括っている。

存性カルシウムチャネル活性を低下させる。Barnes & Bui (1991) は錐体の電位依存性カルシウムチャネル活性が細胞外  $H^+$  濃度に依存して変化することを報じており、pH 説が錐体水平細胞から錐体への負のフィードバックに関する根拠となっている。

- 7) 第2次神経細胞（双極細胞や錐体水平細胞）の樹状突起は錐体シナプス終末のくぼみに入り込み陥入型シナプスを形成しているため、第2次神経細胞のシナプス下膜に発現するシナプスレセプターに化学物質（例えば、神経伝達物質やそのアゴニストとアンタゴニストなど）を作用させるのは極めて難しい。実際、眼杯網膜標本や剥離網膜標本を用いて神経薬理学的実験を行う場合、錐体水平細胞を脱分極させるために非生理的濃度（mM オーダー）の L-Glutamate 投与が必要である（例えば、Murakami & Takahashi, 1987）。しかし、網膜から単離・培養した水平細胞では細胞体や樹状突起が露出しているため、 $\mu M$  オーダーの L-Glutamate 投与で充分である（例えば、Lasater & Dowling, 1982）。このように、陥入型シナプスは特殊かつ複雑な構造を有するため、シナプス間隙は高電気抵抗を持つと考えられている。

- 8) 水素のイオンには、陽イオンである水素イオン ( $H^+$ ) と陰イオンの水素化物イオン ( $H^-$ ) とが存在する。 $H^+$  はプロトン（陽子）そのものであるが、一般的に水素イオン（ヒドロとも呼ぶ。）と表現する。しかし、化学では  $H^+$  の意味でプロトンという用語を用いることが多い。

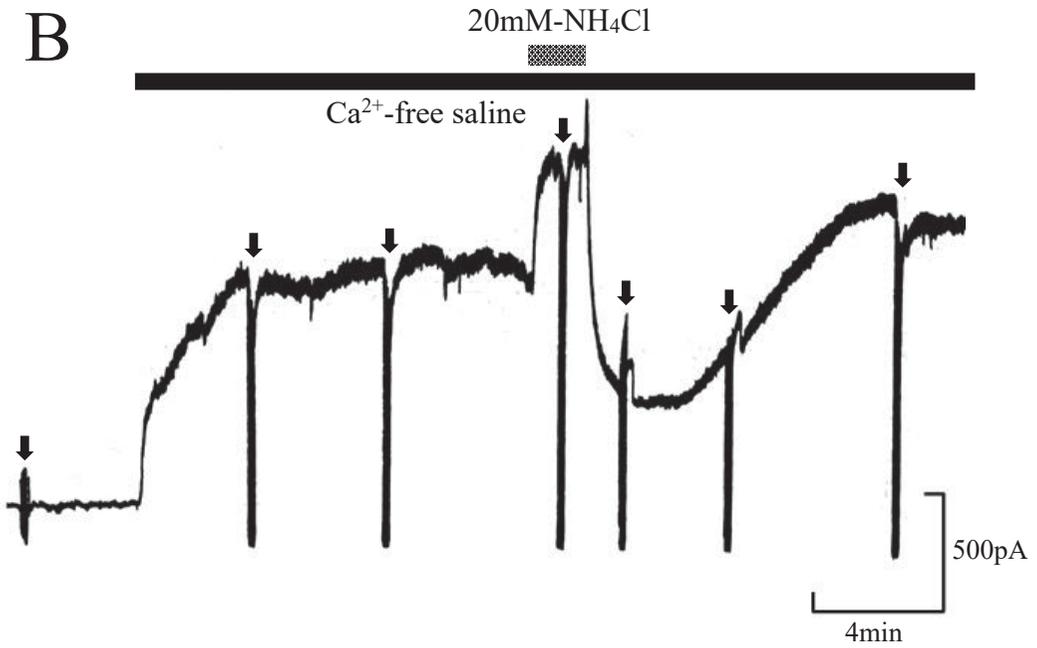
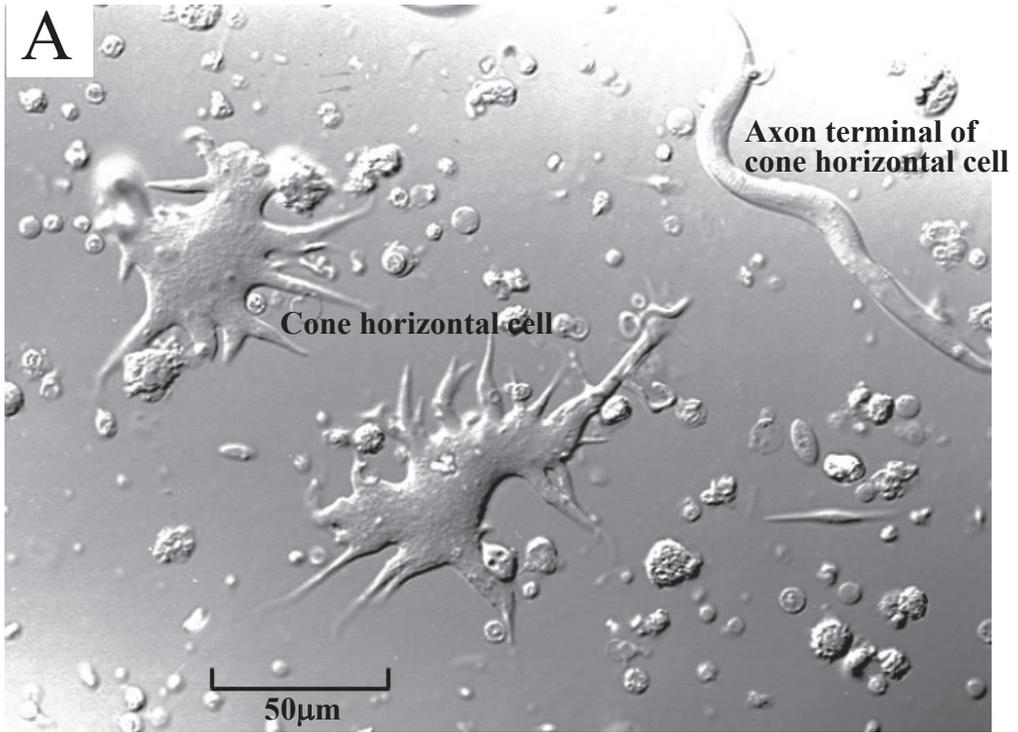
pH は水溶液中の  $H^+$  濃度を表す指標である。水溶液中の  $H^+$  濃度は極めて低く、酸や塩基を加えたときに  $H^+$  濃度は大きく変化する。Sørensen (1909) は  $H^+$  濃度を表現する際、 $H^+$  のモル濃度の逆数の常用対数 ( $pH = -\log_{10} [H^+]$ ,  $[H^+]$  はモル濃度を指す。) を用いることを提案した（現在、pH は  $H^+$  のモル濃度ではなく、 $H^+$  の「活量」で定義されている。しかし、希薄溶液では活量と濃度は近い値を示すので、 $H^+$  濃度で表現することが多い。）。水は極少量解離し、 $H^+$  と水酸化物イオン ( $OH^-$ ) を生じる。 $H^+$  濃度と  $OH^-$  濃度は等しく、 $25^\circ C$  で  $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$  である。このとき、pH は 7 と表現される。濃度が一定であれば、 $H^+$  濃度と  $OH^-$  濃度の積 ( $H^+$  濃度  $\times$   $OH^-$  濃度) は一つとなる。この値は、 $H_2O$  に酸や塩基を加えても一定であり、酸を加えて  $H^+$  の量が 10 倍になれば、 $OH^-$  の量は  $\frac{1}{10}$  となる。 $H^+$  濃度と  $OH^-$  濃度が等しい溶液を中性 ( $pH=7$ ) と呼び、 $H^+$  濃度が高ければ酸性そして  $OH^-$  濃度が高ければアルカリ性と呼ぶ。

シナプス前神経細胞のシナプス終末からシナプス間隙に放出され、シナプス後神経細胞のシナプス下膜に作用して膜電位変化を引き起こす化学物質を神経伝達物質と呼ぶ。これまで、神経伝達物質としてアミン類（例えば、Acetylcholine, Dopamine [ドーパミン] や Adrenaline [アドレナリン] など）、アミノ酸類（例えば、L-Glutamate, GABA や Glycine など）、そしてペプチド類（例えば、Substance P [サブスタンス P], Enkephalin [エンケファリン] や Endorphin [エンドルフィン] など）といった化学物質が数十種類以上知られている。最近、 $H^+$  が神経伝達物質として機能している可能性が議論され始めた（例えば、DeVries, 2001; Kawasaki *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2014, 2017）。

- 9) 脊椎動物の細胞（海産の二等脊椎動物は除く。）では、細胞外のクロライドイオン（塩化物イオンともいう。） ( $Cl^-$ ) 濃度は約 150 mM そして細胞内は約 10 mM である。このため、 $Cl^-$  の平衡電位は  $-70 \sim -80 \text{ mV}$  となる。当然、脊椎動物網膜錐体の  $Cl^-$  の平衡電位も同様であると考えられてきた。Baylor *et al.* (1971) および Baylor & Hodgkin (1973) はカメ (*Pseudemys scripta elegans*) 網膜にガラス管微小電極を適用し、錐体の暗時の膜電位を測定し、約  $-30 \text{ mV}$  であることを明らかにした。後年、Kaneko & Tachibana (1986) はカメ (*Geoclemys reevesii*) 網膜を用いて錐体に惹起される GABA 電流を調査し、 $Cl^-$  の平衡電位が  $-60 \text{ mV}$  付近にあることを示した。錐体水平細胞の脱分極に伴い放出された GABA が錐体に作用すると、錐体は過分極して電位依存性カルシウムチャネル活性を抑制するため、L-Glutamate 放出が減弱する。この結果は、GABA 説を支持している。Thoresen & Burkhardt (1991) はカメ (*Pseudemys scripta elegans*) 網膜用い、錐体の  $Cl^-$  の平衡電位が  $-40 \text{ mV}$  よりも脱分極側にある可能性を報じた。 $Cl^-$  の平衡電位が  $-40 \text{ mV}$  付近にあれば、GABA 説は成立する可能性が高い。最近、Thoresen & Bryson (2004) はサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) 網膜を用い、錐体の暗時の膜電位が  $-46 \text{ mV}$  付近にあること、そして  $Cl^-$  の平衡電位が  $-36 \text{ mV}$  よりも過分極側にあることを報じた。錐体の  $Cl^-$  の平衡電位は未だ不確定であるが、 $Cl^-$  の平衡電位が暗時の膜電位と同じかあるいは脱分極側にあれば GABA 説は成立しない。
- 10) 化学シナプスにおいて、神経伝達物質を受容するシナプス後神経細胞のシナプス部の細胞膜部分を指す。シナプス後膜ともいう。
- 11) シナプスに存在する GABA レセプターとして、イオンチャネル直結型の  $GABA_A$  レセプターと  $GABA_C$

レセプター、およびGタンパク質を介してカルシウムチャネルやカリウムチャネルと共役するGABA<sub>B</sub>レセプターが知られている(例えば、Chebib & Johnston, 1999)。シナプス前神経細胞のシナプス終末から放出されたGABAがシナプス後神経細胞のシナプス下膜に発現するGABA<sub>A</sub>レセプターに結合すると、このレセプターと連動するクロライドチャネルが開口してCl<sup>-</sup>に対する透過性を上昇させ、神経細胞を過分極に導く(例えば、Siegel & Steinmann, 2012)。この過分極は活動電位の発生を抑えるため、GABAによる過分極性膜電位変化を抑制性シナプス電位と呼ぶ。細胞内外のイオン組成が生理的狀態では、GABA<sub>A</sub>レセプターの活性化に伴い発生する膜電位応答の逆転電位は-70~-80 mVにある(この逆転電位は、GABA<sub>A</sub>レセプターと連動するクロライドチャネルを透過するCl<sup>-</sup>の平衡電位を意味している)。ところが、GABA<sub>A</sub>レセプターと連動するクロライドチャネルはCl<sup>-</sup>のみならずチオシオン酸イオン(SCN<sup>-</sup>)、硝酸イオン(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、ヨウ化物イオン(I<sup>-</sup>)、臭化物イオン(Br<sup>-</sup>)、ギ酸イオン(CHOO<sup>-</sup>)、酢酸イオン(CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>)、重炭酸イオン(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、グルコン酸イオン(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub><sup>-</sup>)、フッ化物イオン(F<sup>-</sup>)とリン酸イオン(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)に対する透過性も有している(例えば、Shad & Barry, 1993)。その透過性にはSCN<sup>-</sup>>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>>I<sup>-</sup>>Br<sup>-</sup>>Cl<sup>-</sup>>CHOO<sup>-</sup>>CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>>C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub><sup>-</sup>>F<sup>-</sup>>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>のような序列があることが報じられている(Shad & Barry, 1993)。特に、生理的条件下で細胞内外に存在するHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>は、GABAによって活性化されるイオンチャネルを透過することが古くから知られている(例えば、Kaila *et al.*, 1989)。

- 12) DeVries & Schwartz (1992) は、ナマズ (*Ictalurus punctatus*) 網膜から単離した錐体水平細胞にヘミチャネルを介する膜電流(ヘミチャネル電流)が存在することを見出した(第6図参照)。ヘミチャネル電流は細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度が10 μM以下のとき最大値を示した。ヘミチャネル電流が50%になる細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度は220 μMであり、1 mM以上の細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度では電流値が最大値の4%以下であった。また、この電流はドーパミン、一酸化窒素や細胞内H<sup>+</sup>などで修飾され、Lucifer yellow(蛍光色素)に対する透過性も有していた。最近、Zhang & McMahon (2001) はバス網膜から単離した水平細胞に発現するヘミチャネルの性質を調査し、細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度が高いとき、ヘミチャネル電流が殆ど発生しないことを示した。分子生物学的手法の発展により、*Xenopus* 卵母細胞の発現系を利用したヘミチャネルの研究が始まり、ラット (*Rattus norvegicus*) Cx46、ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) Cx56、そしてウシ (*Bos taurus*) Cx44 が脱分極によって活性化するヘミチャネルとして機能することが報じられた(Paul *et al.*, 1991; Ebihara & Steiner, 1993; Ebihara *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1994)。ところが、細胞外のCa<sup>2+</sup>濃度を1 mM以下にし、膜電位を静止電位から脱分極させると、ヘミチャネルの開口確率を増加させることができるが、Ca<sup>2+</sup>濃度を2 mM程度の生理学的レベルまで上昇させると、開口確率は有意に減少することが明らかとなった(Paul *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1996; John *et al.*, 1999; Zampighi *et al.*, 1999; Ebihara *et al.*, 2003; Sáez *et al.*, 2003, 2005)。*Xenopus* 卵母細胞に発現したCx46ヘミチャネル電流が半分になるCa<sup>2+</sup>濃度は380 μM、そしてCx50ヘミチャネル電流が半分になるCa<sup>2+</sup>濃度は100 μMであった(Zampighi *et al.*, 1999; Ebihara *et al.*, 2003)。ヘミチャネルの外部にはCa<sup>2+</sup>ゲートが存在していると考えられ、Cx26とCx32ヘミチャネルのCa<sup>2+</sup>ゲートはコネクシンの細胞外にある酸性アミノ酸残基から形成されることが提案されている(Gómez-Hernández *et al.*, 2003; Zonta *et al.*, 2012)。現在、水平細胞を含む神経細胞に発現するヘミチャネルが生理的条件下でイオンの通路となっているのか否かは不明である。つまり、網膜水平細胞から視細胞への負のフィードバックにエファプス説が関与していることを証明するには、少なくともヘミチャネルの機能解明が不可避である。
- 13) 電気シナプスで機能するギャップ結合チャネルは1対のコネクソン(ヘミチャネルあるいは半チャネルとも呼ぶ)が対合し、両細胞を繋ぐ物質通路として機能する。驚くべきことに、ヘミチャネルが対合せずに単独で機能し、細胞内外の物質通路(イオンのみならずcAMP、ATPやL-Glutamateの通路として機能している)であることが明らかになってきた(Cotrina *et al.*, 2000; Valiunas & Weingart, 2000; Contreras *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2010; Orellana *et al.*, 2011; Valiunas, 2013)。近年、ヘミチャネルを電気生理学的に解析するため、*Xenopus* 卵母細胞やHela細胞に遺伝子導入して細胞膜にヘミチャネルを発現させ、このチャネルを解析する方法が良く利用されている(例えば、Ebihara & Steiner, 1993; Ebihara, 1996)。発現系を利用した研究において、コネクシンが構成するヘミチャネルは生理的条件下で機能する可能性が高いと考えられた(Ebihara & Pal, 2000)。しかし、ヘミチャネルは細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度が低い状況で、脱分極に伴い開口し、生理的条件下(例えば、膜電位が過分極の状態で、細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度が1~2 mMというような状態を指す)でどの程度のこのチャネルが開口しているのか否かが問題となっている(例えば、Sáez *et al.*, 2005)。Kamermans *et al.* (2001) はコイ (*Cyprinus*



*carpio*) 網膜水平細胞のシナプス下膜 (樹状突起の先端部) にコネキシン26 (Cx26) ヘミチャネルが発現していることを免疫組織化学法で確認し、これが錐体水平細胞から錐体への負のフィードバック (エファプス伝達) に関与することを報じた。実際、ギャップ結合チャネル阻害剤である Carbenoxolone が錐体の電位依存性カルシウムチャネルに影響することを明らかにし、Cx26 ヘミチャネルが機能している可能性を示した。Ripps *et al.* (2004) は Cx26 を発現させた *Xenopus* 卵を用いて、このヘミチャネルの性質を解析し、⑦ Cx26ヘミチャネルは生理的膜電位 (-40~+40 mV) の範囲内で大きな膜コンダクタンスを有すること、⑧ Quinine には非感受性であるが、Carbenoxolone で抑制されること、⑨細胞外 Ca<sup>2+</sup> 上昇で抑制されること (+40 mV に膜電位固定し、細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度を 0.74 mM にして得られたヘミチャネル電流は細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度を 3.5 mM にすると約20%にまで減少し、また細胞外 Ca<sup>2+</sup> を 0.1 mM にすると約200%に増加した。)、そして⑩細胞内外の H<sup>+</sup> 上昇で抑制されることなどを明らかにした。この研究は、Cx26 ヘミチャネルが過分極から脱分極までの幅広い膜電位で活性化するが、生理的状態の細胞外 Ca<sup>2+</sup> で運ばれる膜電流は微弱であることを示唆している。従って、錐体水平細胞の樹状突起に発現する Cx26 ヘミチャネルがエファプス伝達に関与するには、Cx26 ヘミチャネル電流 (生理的条件下で、ヘミギャップ電流は微弱であると推測される。) が錐体シナプス終末陥入部シナプス間隙とシナプス外の間形成される電気抵抗の高い局所回路を流れることが必要となる。不幸なことに、動物種によっては水平細胞に Cx26 が発現していないという報告も現れ、ヘミチャネルに動物種差があるかあるいはヘミチャネルが発現していない可能性が浮上している (Deans & Paul, 2001; Hombach *et al.*, 2004; Zoidl *et al.*, 2004)。最近、Canedese *et al.* (2017) は負のフィードバックに時間的に異なる 2 タイプが存在し、時間的に速いタイプには Cx55.5ヘミチャネルを介するエファプス伝達、そして時間的に遅いタイプには Panx1 チャネルを介する pH 伝達に関与していることが報じられた。Kamermans の研究グループの努力により、エファプス伝達の可能性が辛うじて継続している。

- 14) 脊椎動物において、ギャップ結合を形成する一群の膜貫通型タンパク質をコネキシン (Connexin) という (例えば、Meşe *et al.*, 2007)。一方、無脊椎動物ではイネキシン (Innexin) と呼ばれる膜貫通型タンパク質がギャップ結合を形成している (Starich, 1996; Consortium, 1998)。しかし、コネキシンとイネキシンにアミノ酸配列の相同性は認められない (Phelan & Starich, 2001)。最近、脊椎動物にイネキシン遺伝子のホモログ (塩基配列の似通った遺伝子) が見出され、パネキシン (Pannexin) と命名された (Baranova *et al.*, 2004)。分子構造の類似性からパネキシンは、当初ギャップ結合チャネルやヘミチャネルを形成する膜貫通型タンパク質であると考えられた (Panchin, 2005; Barbe *et al.*, 2006; Scemes *et al.*, 2009)。現在、パネキシン 1~3 (Panx1~3) の 3 種類が同定され、Panx1 と 2 は中枢神経系そして Panx3 は骨軟骨に発現することが報じられている (Bruzzone *et al.*, 2003)。パネキシンによって形成されるチャネルはコネキシンと区別するために、パネキシンチャネルと呼ばれる。Panx1 チャネルの開口は膜電位が-35 mV 以上の脱分極で生じること、生理的濃度の細胞外 Ca<sup>2+</sup> によって開口すること、そして細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度変化によって修飾されることが知られている (Bruzzone *et al.*, 2003; Lovcevi *et al.*, 2006; Prochnow *et al.*, 2009; Kurtenbach, *et al.*, 2013)。最近、パネキシンはギャップ結合チャネルを形成せず、少なくとも細胞膜に存在する Panx1 チャネルはヘミチャネルではないと考えられている (Sosinsky *et al.*, 2011)。

#### 第 6 図：ナマズ網膜から単離した錐体水平細胞に惹起されるヘミチャネル電流

A : 単離直後の 2 つの錐体水平細胞 (Cone horizontal cell) と錐体水平細胞の軸索終末 (Axon terminal of cone horizontal cell) の顕微鏡写真である。単離操作により、錐体水平細胞の軸索および軸索終末は切り離され、別々に存在している。錐体水平細胞の樹状突起は錐体シナプス終末陥入部に深く入り込んで存在するが、単離操作で陥入部に入り込んだ樹状突起 (シナプス下膜を含む。) は切断されて無くなっていると推測される。水平細胞の周辺には、多数の細胞残骸が浮遊している。B : 単離した錐体水平細胞の膜電位を +20 mV に固定し、膜電流を記録した。正常リンガー液を無 Ca<sup>2+</sup> リンガー液 (Ca<sup>2+</sup>-free saline) に置換すると、時間経過の極めて緩やかな外向き電流が発生し、数分後にピークに達した。20 mM-NH<sub>4</sub>Cl を添加した無 Ca<sup>2+</sup> リンガー液 (アンモニウム無 Ca<sup>2+</sup> リンガー液) を灌流 (水平細胞 H<sup>+</sup> 濃度は減少、すなわちアルカリ化する。) すると、この外向き電流は増大し、NH<sub>4</sub>Cl を洗い流す (水平細胞内 H<sup>+</sup> 濃度は上昇、すなわち酸性化する。) と外向き電流は減少した。十数分後には、外向き電流は元のレベルにまで回復した。下向き矢印では、+20 mV に固定した膜電位を -10 mV から -60 mV まで 10 mV ステップ刻みで過分極させて発生する膜電流変化を調査したが、本図には示していない。

## 【補助説明】

## (1) 第6図の実験

## 【実験材料と方法】

実験には、体長約 40 cm のナマズ (*Ictalurus punctatus*) を用いた。ナマズを 2 時間以上暗順応させた後、断頭し、眼球を摘出した。この眼球を 70% エタノール中に約 20 秒間浸し、消毒した。前眼部、水晶体および硝子体は除去し、その後網膜を剥離した。剥離網膜を 2 mm 幅に切断し、Papain 処理と機械処理を併用して水平細胞を単離した (Tachibana, 1981)。単離水平細胞は、直径 12 mm の円形カバーガラス上で培養した。培養には魚類用に調整した L-15 培養液を用い、14°C で単離水平細胞を維持した。2 日以上培養した錐体水平細胞を実験に用いた。錐体水平細胞が生存するカバーガラスを倒立顕微鏡 (model IM-35, Carl Zeiss, Inc.) に装着した記録槽内に置き、細胞から 200~400  $\mu\text{m}$  離れた位置に先端直径 150  $\mu\text{m}$  の Y-tube を設置しリンガー液を灌流した。

アメリカナマズの正常リンガー液の組成は、125.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl)、2.6 mM 塩化カリウム (KCl)、5.0 mM 塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ )、1.0 mM 塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ )、15.0 mM ブドウ糖 (Glucose) と 10.0 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) であった。ヘミギヤップ結合チャネルを活性化するために、無  $\text{Ca}^{2+}$  リンガー液 (第 5 図 B に、無  $\text{Ca}^{2+}$  リンガー液は  $\text{Ca}^{2+}$ -free saline を表現した。) を灌流した。無  $\text{Ca}^{2+}$  リンガー液の組成は、100.0 mM NaCl、5.0 mM KCl、1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、15.0 mM 塩化セシウム (CsCl)、15.0 mM Tetraethylammonium Chloride (TEA-Cl)、20.0 mM Glucose と 10.0 mM HEPES であった (電位依存性カリウムチャネルの活性を抑えるため、CsCl と TEA-Cl をリンガー液に添加した。)。細胞内 pH を変化させる目的で、アンモニウム無  $\text{Ca}^{2+}$  リンガー液 (第 5 図 B に、アンモニウム無  $\text{Ca}^{2+}$  リンガー液は 20 mM- $\text{NH}_4\text{Cl}$  と表現した。) を灌流した。アンモニウム無  $\text{Ca}^{2+}$  リンガー液の組成は 80.0 mM NaCl、20.0 mM 塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )、5.0 mM KCl、1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、15.0 mM CsCl、15.0 mM TEA-Cl、20.0 mM Glucose と 10.0 mM HEPES であった。何れのリンガー液も、1 N-NaOH を用いて pH7.8 に調整し灌流した。これらのリンガー液の浸透圧は、約 280 mOsm/kg であった。

標準パッチ電極内液の組成は 115.0 mM グルコン酸カリウム (K-gluconate)、15.0 mM CsCl、15.0 mM TEA-Cl、2.0 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1.0 mM Ethylene Glycol-bis ( $\beta$ -aminomethyl Ether) N, N, N', N'-Tetraacetic Acid (EGTA)、1.0 mM Adenosine 5'-Triphosphate (ATP)、1.0 mM Guanosine 5'-Triphosphate (GTP) と 10 mM HEPES であった (電位依存性カリウムチャネルの活性を抑えるため、CsCl と TEA-Cl をパッチ電極内液に添加した。)。アンモニウム無  $\text{Ca}^{2+}$  リンガー液を灌流する実験では、パッチ電極内液から HEPES を除去した (このとき、K-gluconate を 120.0 mM にした。)(アンモニウムパッチ電極内液)。アンモニウムパッチ電極内液の pH は、実験直前に 1 N-水酸化カリウム (KOH) を用いて 7.4 に調整して使用した。この条件下で、パッチ電極内液の pH は、少なくとも 2 時間は安定であった。パッチ電極内液の浸透圧は、約 265 mOsm/kg であった。

Whole-cell voltage-clamp 法を適用し、水平細胞を膜電位固定し電流記録を行った (Hamil *et al.*, 1981)。パッチ電極は Brown-Flaming 型微小電極製作器 (P87, Sutter Instrument Co.) あるいは垂直型微小電極製作器 (PP-83, 成茂科学) を使って、直径 1.5 mm のホウケイ酸ガラス管 (SF2714R, Garner Glass) から作製した。電極抵抗は 5~10 M $\Omega$  であった。水平細胞の膜電流は、Whole-cell voltage-clamp 用増幅器 (Axopatch-1D, Axon Instrument) を使い、2 KHz (4 次ベッセルフィルター) のフィルターを介してオシロスコープで観察した。同時に、この信号は、10 KHz でデジタル化 (Labmaster DMA, Scientific Solution) してコンピューターに取り込んだ。必要に応じて、電流応答を再生し、解析した。電流解析には、カレイダグラフ (Synergy Software) を用いた。

薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。ただし、Papain は Worthington Biochemical Co. から、そして L-15 は Gibco から購入した。