

魚類網膜水平細胞の細胞内水素イオン濃度調節と 修飾に関する研究

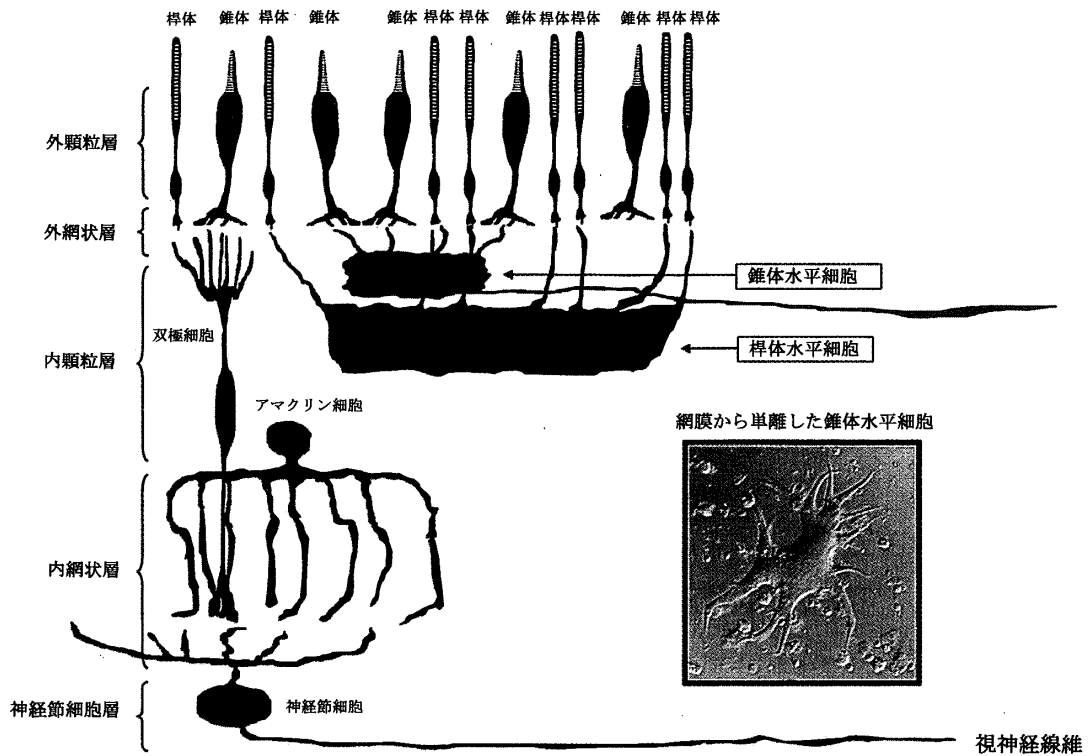
高橋 恭 一

(受付 2002年9月30日)

序 論

脊椎動物網膜は、視細胞、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞および神経節細胞の5種類の神経細胞からなる(第1図)。視細胞で受容された明暗情報は、電位応答に変換され、第二次神経細胞である双極細胞と水平細胞にシナプス伝達される。双極細胞では、受容野中心部と周辺部とで光応答極性が逆転する同心円型中心-周辺拮抗的受容野が形成される。これは、形態視におけるコントラスト強調の初期過程と考えられている。また、水平細胞では三原色説過程から反対色説過程への変換が行われる。これは、色覚の初期過程であると考えられている。双極細胞や水平細胞からの出力はアマクリン細胞や神経節細胞に収斂するが、この過程でさらに高度な情報処理(例えば、運動視)が行われる。

脊椎動物網膜の視細胞は、昼間視を司る錐体と薄明視を司る桿体の2種類に分類される。両者は機能的・形態的に大きく異なっている。錐体では、外節の形質膜が内側に折り畳まれ層状構造を形成し、この層状構造に錐体視物質が存在している。一方、桿体では、外節内に二重膜円盤が数百枚以上重なり層状構造を形成し、この円盤膜上に光感受性物質の桿体視物質(ロドプシン)が存在している。視物質が光を受容するメカニズムに関しては、桿体でよく調べられている。光が桿体外節内にある円盤に到達すると、この円盤膜状にあるロドプシンに光化学反応が起こる。ロドプシンは連鎖的化学反応を繰り返し、メタロドプシンIIへと変化する。メタロドプシンIIはトランスデューシンを活性化し、そしてトランスデューシンはホスホジエステラーゼを活性化する。この結果、桿体の細胞質に存在する cyclic Guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) は Guanosine 5'-monophosphate に分解され、一連の光化学反応は終了する(例えば, Kawamura, 1993, 1994)。桿体外節の形質膜内側には、cGMPの結合に伴い開口するナトリウムチャンネルが存在する。暗時には大量のcGMPが細胞質に存在するため、cGMP依存性イオンチャンネルが開口している。この結果、ナトリウムイオン(Na^+)は電気化学的勾配に従い細胞外から内に流入し、桿体は脱分極している。光受容に伴い細胞質のcGMP濃度が減少すると、このチャンネルは閉塞し、 Na^+ の流入が減少あるいは消失するため、桿体は過分極する(例えば, Pugh & Lamb, 1990, 1993; Kawamura, 1993, 1994)。



第1図 魚類網膜における神経細胞構築

脊椎動物網膜は、視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞および神経節細胞によって構成されている。視細胞（錐体と桿体）のみが光感受性を有し、他の神経細胞は視覚情報処理に当たる。視細胞は、光に対して感受性の高い桿体と低い錐体に分類される。視細胞で受容された明暗情報は電気信号に変換され、縦方向に配置した細胞群（視細胞、双極細胞と神経節細胞）と横方向に配置した細胞群（水平細胞およびアマクリン細胞）による情報処理を経て、脳にシナプス伝達される。視細胞の細胞体が存在する部位を外顆粒層、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と呼ぶ。また、視細胞、双極細胞と水平細胞がシナプス連絡する部位を外網状層、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と呼ぶ。視覚情報処理は外網状層と内網状層で行われ、神経節細胞の軸索である視神経を経て脳に伝播される。魚類網膜の水平細胞は、錐体とシナプス結合する錐体水平細胞と桿体とシナプス結合する桿体水平細胞の2種類に分類される。色覚を持つ魚類の網膜には、3種類の錐体（赤錐体、緑錐体と青錐体）のそれぞれと独占的にシナプス結合する錐体水平細胞（単相性水平細胞、二相性水平細胞と三相性水平細胞）がある。因みに、本研究で用いたアメリカナマズの網膜には、赤錐体と桿体の2種類の視細胞しか存在しない。赤錐体は錐体水平細胞（単相性水平細胞）と桿体は桿体水平細胞とシナプス連絡していることが明らかになっている。挿入図は、2日間培養したアメリカナマズ網膜の錐体水平細胞の顕微鏡写真を示す。

錐体でも、桿体と同様のメカニズムで光信号が膜電位変化に変換されると考えられている (Haynes & Yaw, 1985; Watanabe & Murakami, 1991; Picones & Korenbrot, 1994)。視細胞外節で発生した膜電位変化は、内節に存在するカルシウムチャンネル、h（内向き整流性陽イオン）チャンネル、カルシウム依存性カリウムチャンネル、カルシウム依存性クロライドチャンネルによる修飾（例えば、Bader *et al.*, 1979; Fain & Quandt, 1980a; Fain *et al.*, 1978a, 1978b,

1980b; Takahashi, 1986; Barnes, 1994) を受け、シナプス終末に達する。シナプス終末では、この膜電位変化に応じた量の伝達物質 (L-グルタミン酸) が放出される (Trifonov, 1968; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987, 1988; Takahashi & Murakami, 1987, 1991; Copenhagen & Jahr, 1989; Ayoub *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 1995)。視細胞からの伝達物質放出は、暗時 (脱分極時) に増大し、明時 (過分極時) に減少する。

双極細胞は、光照射に伴い脱分極する ON 中心型双極細胞と過分極する OFF 中心型双極細胞に分類される (Werblin and Dowling, 1969; Kaneko, 1970, 1973, 1979, 1983; Saito *et al.*, 1978, 1979a, b; Saito & Kujiraoka, 1982; Kaneko & Tachibana, 1982; Saito & Kaneko, 1983; Kaneko & Saito, 1983; Saito *et al.*, 1984; Saito, 1987)。このような光応答極性の相違は、シナプス下膜に発現するシナプス受容体が異なることによる。ON 中心型双極細胞には、代謝調節型グルタミン酸受容体が発現している (Slaughter & Miller, 1981; Shiells *et al.*, 1981; Attwell *et al.*, 1987; Nawy & Jahr, 1990, 1991; Shiells & Folk, 1990, 1992a, b; Yamashita & Wässle, 1991; Villa *et al.*, 1995)。この受容体での分子機構は、視細胞での光受容機構と酷似している。すなわち、暗時に視細胞から放出された L-グルタミン酸が代謝調節型グルタミン酸受容体に結合すると、G タンパク質を介してホスホジエステラーゼが活性化し、この結果 cGMP が分解されるため陽イオンチャネルが閉じて過分極する。明時には、細胞内に cGMP が多量に存在するため、陽イオンチャネルは開口し脱分極する。一方、OFF 中心型双極細胞にはイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体が発現し、この受容体に L-グルタミン酸が結合すると陽イオンチャネルは開口するため、光照射に伴い過分極する (Murakami *et al.*, 1975; Kaneko & Shimazaki, 1976; Attwell, 1986; Attwell *et al.*, 1987; Sasaki & Kaneko, 1996)。両タイプの双極細胞は共に、受容野中心部と周辺部とで応答極性が反転する、いわゆる同心円型中心-周辺拮抗的受容野を有している。

水平細胞にはイオンチャネル直結型グルタミン酸受容体が発現しているため、OFF 中心型双極細胞と同様、光照射に伴い過分極する (Murakami *et al.*, 1972; Rowe & Ruddock, 1982a, b; Takahashi & Murakami, 1988)。色覚を有する下等脊椎動物 (魚類, 両生類と爬虫類) では、3 種類存在する錐体 (赤錐体, 緑錐体と青錐体) が異なるタイプの水平細胞 (単相性水平細胞, 二相性水平細胞と三相性水平細胞) とシナプス結合している。錐体での三原色説応答は、水平細胞では反対色説応答へと変換されるが、このメカニズムについては未だ完全には解明されていない (Tomita, 1963, 1965; Naka & Rushton, 1967; Gouras, 1972; Daw, 1973; Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Witkovsky *et al.*, 1995)。一方、桿体は錐体水平細胞とのシナプス連絡はなく、別の水平細胞 (桿体水平細胞) とシナプス結合している (Tomita, 1963, 1965)。同種の水平細胞はギャップ結合 (電気シナプス結合) しているため、水平細胞は数 mm にも及ぶ大きな受容野を持って

いる (Yamada & Ishikawa, 1965; Kaneko, 1971; Stell & Lightfoot, 1975; Witkovsky *et al.*, 1983; Baldrige *et al.*, 1987, 1998; Vaney, 1993)。この受容野は、双極細胞の同心円型中心-周辺拮抗的受容野の周辺受容野形成に関与していると推測されている (Werblin & Dowling, 1969; Naka & Witkovsky, 1972; Toyoda & Tonosaki, 1978; Davis & Naka, 1980)。

双極細胞の出力は、アマクリン細胞および神経節細胞に収斂する (第1図参照)。アマクリン細胞は樹状突起が広範に伸展 (Chino & Hashimoto, 1986; Teranishi *et al.*, 1987; Djamgoz *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1991) しているのに加え、同種および異種のアマクリン細胞がギャップ結合 (Naka & Christensen, 1981; Teranishi *et al.*, 1984; Vaney, 1991; Hampson *et al.*, 1992; Hidaka *et al.*, 1993) を介して結合しているため、極めて大きな受容野を有している。受容野内を一定方向にのみ移動する明体に応ずる方向検出型アマクリン細胞や受容野内に明体が入ったときおよび出たときに応答を発生する動き検出型アマクリン細胞が存在することから、アマクリン細胞の機能として運動視の初期過程が考えられている (例えば, Massey and Redburn, 1987; Daw *et al.*, 1989)。

視細胞、水平細胞、双極細胞およびアマクリン細胞 (アマクリン細胞の一部は活動電位を発生する) は活動電位を発生せず、緩電位応答のみで視覚情報処理を行っているためアナログ型神経細胞と言われる。このアナログ応答は神経節細胞でデジタル応答に変換される。以降、視覚情報はデジタル信号として脳に伝播される。神経節細胞には双極細胞で形成された同心円型拮抗的受容野 (形態視)、水平細胞で形成された反対色説過程 (色覚)、さらにアマクリン細胞で形成された物体の動きに関する情報 (運動視) が収斂するため、時空間特性は極めて複雑である (例えば, Cleland & Harding, 1983; Nelson & Kolb, 1983; Stein *et al.*, 1983; Wässle & Boycott, 1991)。

網膜内における視覚情報処理を理解するには、①神経細胞膜に発現するイオンチャネルおよびリガンド受容体の解析、②神経細胞間の化学的および電氣的シナプス結合とその機構の解析に加え、③セカンドメッセンジャー系の解析が不可欠である。最近では、網膜内から単離・培養した神経細胞にガラス管微小電極法 (例えば, Tachibana, 1981; Takahashi *et al.*, 1993), パッチクランプ法 (例えば, Hamil *et al.*, 1981) あるいはイメージング法 (例えば, Grinvald *et al.*, 1988) を適用して、詳細な解析が行われるようになってきた。例えば、網膜内神経細胞の電位依存性イオンチャネル (カルシウムチャネル、遅延性カリウムチャネル、一過性カリウムチャネルや内向き整流性カリウムチャネルなど)、リガンド受容体 (グルタミン酸受容体、グリシン受容体や γ -アミノ酪酸 (GABA) 受容体など)、トランスポーター (グルタミン酸トランスポーターや GABA トランスポーターなど)、エキスチェンジャー (Na^+ /水素イオン (H^+) エクスチェンジャーや (クロライドイオン) Cl^- /(重炭酸イオン) HCO_3^- エクスチェンジャーなど) やポンプ (Na^+ /カリウムイオン (K^+) ポンプやカルシウムイオン

(Ca^{2+})/ H^+ ポンプなど)の生理学的, 生物物理学的および薬理学的性質が解明されている(例えば, Tachibana, 1981, 1983; Lasater & Dowling, 1982; Shingai & Christensen, 1983, 1986; Dixon *et al.*, 1993, 1996; Takahashi *et al.*, 1993, 1994, 1995a, b; Haugh-Scheidt & Ripps, 1998; Krizaj & Copenhagen, 1998)。特に, パッチクランプ法とイメージング法はこれまで不十分だった細胞内セカンドメッセンジャー系の解析にも威力を発揮し, イオンチャネルやリガンド受容体が細胞内因子である G タンパク質, cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP), cGMP, Adenosine 5'-triphosphate (ATP), イノシトール三リン酸, Ca^{2+} やプロテインキナーゼ A やプロテインキナーゼ C などにより調節されていることを明らかにした。

近年, これまで殆ど注目されていなかった細胞内 H^+ がイオンチャネルやリガンド受容体を修飾するセカンドメッセンジャーとして機能する可能性が報告され, 注目を集めている。現在, この可能性を検討すべく, 多くの研究者が神経機能の細胞内 H^+ による修飾や神経細胞内 H^+ 濃度 (pH) の調節に関する研究を進めている(例えば, Moody, 1984; Chesler & Kaila, 1992; Kaila, 1994; Burckhardt *et al.*, 2002)。これまでに, 著者らも水平細胞のカルシウムチャネル, 内向き整流性カリウムチャネルやヘミギャップ結合チャネルの活性が細胞内水素イオンにより修飾されることを見出し, 報告している(Dixon *et al.*, 1993, 1996; Takahashi *et al.*, 1993; Takahashi & Copenhagen, 1995)。

本研究では, 空間情報処理と色覚情報処理に重要な役割を果たしている水平細胞の細胞内水素イオン濃度調節機構並びにその修飾機構について調べた。

実験材料と方法

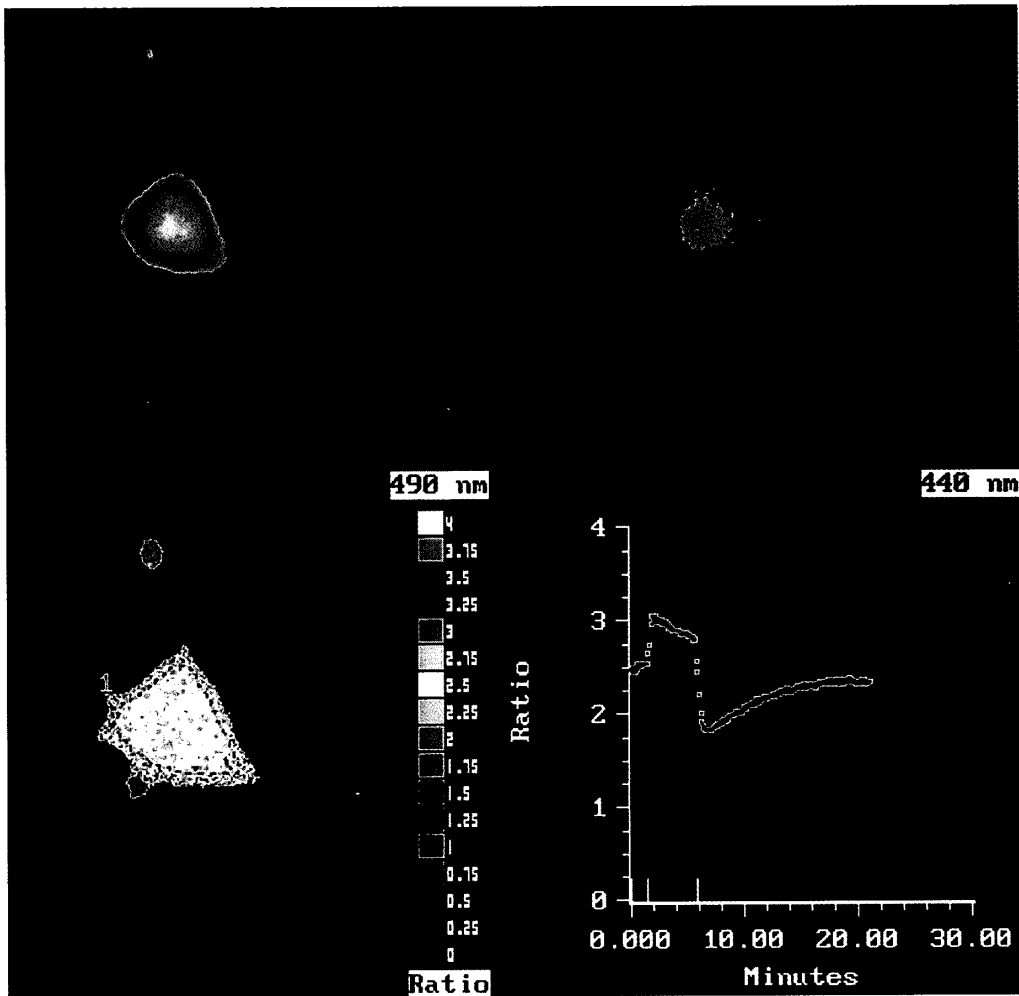
実験には, 体長約 40 cm のアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) を用いた。ナマズを 2 時間以上暗順応させた後, 断頭し, 眼球を摘出した。この眼球を 70% エタノール中に約 20 秒間浸し, 消毒した。前眼部, 水晶体および硝子体は除去し, その後網膜を剥離した。剥離網膜を 2 mm 幅に切断し, Papain 処理して単離水平細胞を用意した(Tachibana, 1981)。単離水平細胞は, 円形(直径 12 mm)のカバーグラス上で培養した。培養には, 魚類用に調整した L-15 (14°C) 培養液を用いた。2 日以上培養した水平細胞を実験に用いた。アメリカナマズ網膜には, 2 種類の水平細胞(錐体水平細胞と桿体水平細胞)が存在する。両者は大きさと形態が著しく異なっており, 顕微鏡下で容易に区別できた。また, 培養すると, 桿体水平細胞は死滅し, 錐体水平細胞のみが生き残った(第 1 図挿入図参照)(高橋, 2000)。従って, 実験には錐体水平細胞の細胞体を用いた(以降, 錐体水平細胞を水平細胞と記載する)。水平細胞の生存するカバーグラスを倒立顕微鏡(model IM-35, Carl Zeiss, Inc.)に装着した記録槽内に置き, リンガー液を細胞から 200 μm ~ 400 μm の距離に置いた Y-tube (直径 150

μm) により灌流した。

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 (CaCl_2), 1.0 mM 塩化マグネシウム (MgCl_2), 15.0 mM ブドウ糖 (Glucose), 10.0 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) であった。細胞内 pH を変化させるため、20 mM の塩化アンモニウム (NH_4Cl) をリンガー液に添加し用いた (アンモニウムリンガー液)。リンガー液中の NH_4Cl はアンモニウムイオン (NH_4^+) とクロライドイオン (Cl^-) に解離する。さらに、 NH_4^+ はアンモニア (NH_3) と H^+ に解離する。 NH_4^+ と NH_3 は細胞内に移動し、 NH_3 は H^+ と反応して NH_4^+ を形成する。この結果、細胞内はアルカリ化する。 NH_4Cl を洗い流すと、最初に細胞内に流入した NH_4^+ と細胞内で形成された NH_4^+ は解離し、 NH_3 と H^+ になる。 NH_4^+ の量は細胞内で形成された量と最初に細胞内に入った量の総和であるから、結果的に発生する H^+ の量はアンモニウムリンガー液灌流前よりも多くなる。この結果、細胞内は酸性化する。最後に、 NH_3 は細胞外に排出される。このアンモニウムリンガー液の組成は 105.0 mM NaCl, 20.0 mM NH_4Cl , 2.6 mM KCl, 5.0 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 15.0 mM Glucose, 10.0 mM HEPES であった。また、リンガー液のナトリウムイオン (Na^+) を除去する場合には、正常リンガーの NaCl を *N*-methyl-D-glucamine-Cl (NMDG-Cl) に置換し、 Na^+ -欠如リンガー液を作成し、灌流した。何れのリンガー液も、1N-水酸化ナトリウムあるいは 1N-水酸化カリウムを用いて pH7.8 に調整し、用いた。Amiloride (1 mM), Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA; 1 μM) および *N*-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide hydrochloride (H-8; 30 μM) は浸透圧を考慮せずに、これらリンガー液に添加し、Y-tube で投与した。

単離した水平細胞の細胞内 pH 測定には、pH 感受性蛍光色素である 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and6) Carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM) を用いた。BCECF-AM (5 μM) を含むリンガー液中に水平細胞を 5 分間放置し、その後リンガー液で洗い流した。約 40 分後 pH 測定を開始した。pH 測定は水平細胞の中心部分で行った。バンドパスフィルターを用いて 490 nm (Omega Optical, Inc.) と 440 nm (Omega Optical, Inc.) の単色光を 200 msec 間水平細胞に照射し、励起された蛍光から 535 nm (Omega Optical, Inc.) の単色光だけを冷却デジタル CCD カメラ (Photometrics, Inc.) で検出し、解析ソフトウェア (Metafluor; Universal Imaging Co.) を用いて比を求め、細胞内 pH の指標とした。比の増大はアルカリ化、減少は酸性化であった (第 2 図参照)。実験終了後、この比を nigericin 法を用いて細胞内 pH に換算した。データ処理には、Excel 2002 (Microsoft Co.) を用いた。

水平細胞での Na^+/H^+ エクスチェンジャーの極在を調べるため、BODIPY FL amiloride による生きた細胞の染色を試みた。BODIPY FL amiloride (2.5 μM) を含むリンガー液中に水



第2図 網膜から単離した水平細胞の細胞内 pH 測定

pH 感受性蛍光色素である 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and6) Carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM; 5 μ M) を含むリンガー液中に単離水平細胞を 5 分間放置し、その後正常リンガー液で洗い流した。36分後に、pH 測定を開始した。490 nm (左上) と 440 nm (右上) の単色光を 200 msec 間水平細胞に照射し、励起された蛍光から 535 nm (左下) の単色光だけを冷却デジタル CCD カメラで検出し、解析ソフトウェアを用いて比 (右下) を求め、細胞内 pH の指標とした。pH 測定は、左下の図に示されている点線で囲んだ部分で行った。比の増大はアルカリ化、減少は酸性化である。本図では、490 nm と 440 nm の単色光で励起された蛍光とその比を、擬似カラー表示した。右下には、①アンモニウムリンガー液を灌流した際の細胞内アルカリ化、②正常リンガー液に戻した際の酸性化そして③この酸性化からの回復過程を示した。この擬似カラーデータは、③の一コマである。実験終了後、nigericin 法を用いて比を細胞内 pH に換算した。

平細胞を約 5 分間放置し、495 nm の単色光を細胞に照射した。水平細胞膜上の Na^+/H^+ エクスチェンジャーへの BODIPY FL amiloride の結合に伴う蛍光が観察された。蛍光観察には細胞内 pH 記録に用いたシステムを用い、この蛍光を擬似カラーで表示した。記録槽内を正常リンガー液で20分間灌流し、BODIPY FL amiloride を完全に洗い流しても、蛍光は観察された。しかし、90分間正常リンガー液を灌流した後、蛍光は殆ど観察されなくなった。

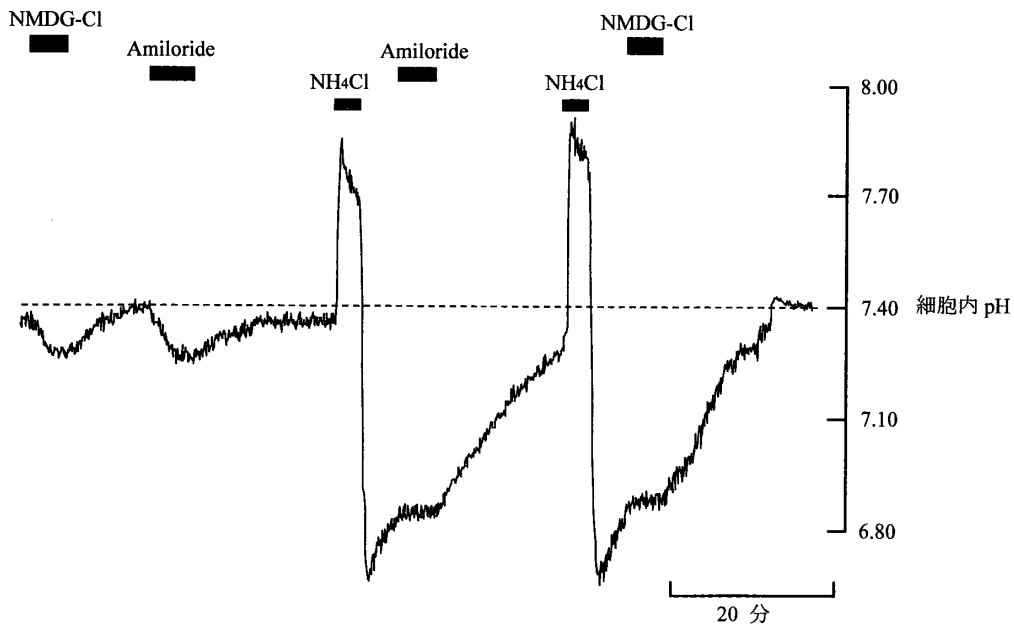
薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。Papain は Worthington Biochemical Co. から、TPA は Research Biochemicals, Inc. から、BCECF-AM, nigericin および BODIPY FL amiloride は Molecular Probes, Inc. から購入した。

実験結果

水平細胞の細胞内 pH とその調節機構

正常リンガー液 (pH7.8) 中での水平細胞の細胞内 pH は、 7.40 ± 0.06 (平均 \pm 標準偏差, 細胞数 [n]=18) であった。

Na^+/H^+ エクステンジャーが細胞内 pH 調節に関与しているか否かを検討するため、細胞外の Na^+ を除去する実験と amiloride を投与する実験を行った (第3図)。細胞外液を正常リンガー液から Na^+ -欠如リンガー液に交換すると、細胞内 pH は約0.12下降 (酸性化) した。次に、amiloride (1 mM) を正常リンガー液に添加し投与すると、細胞内は約0.13程度酸性化

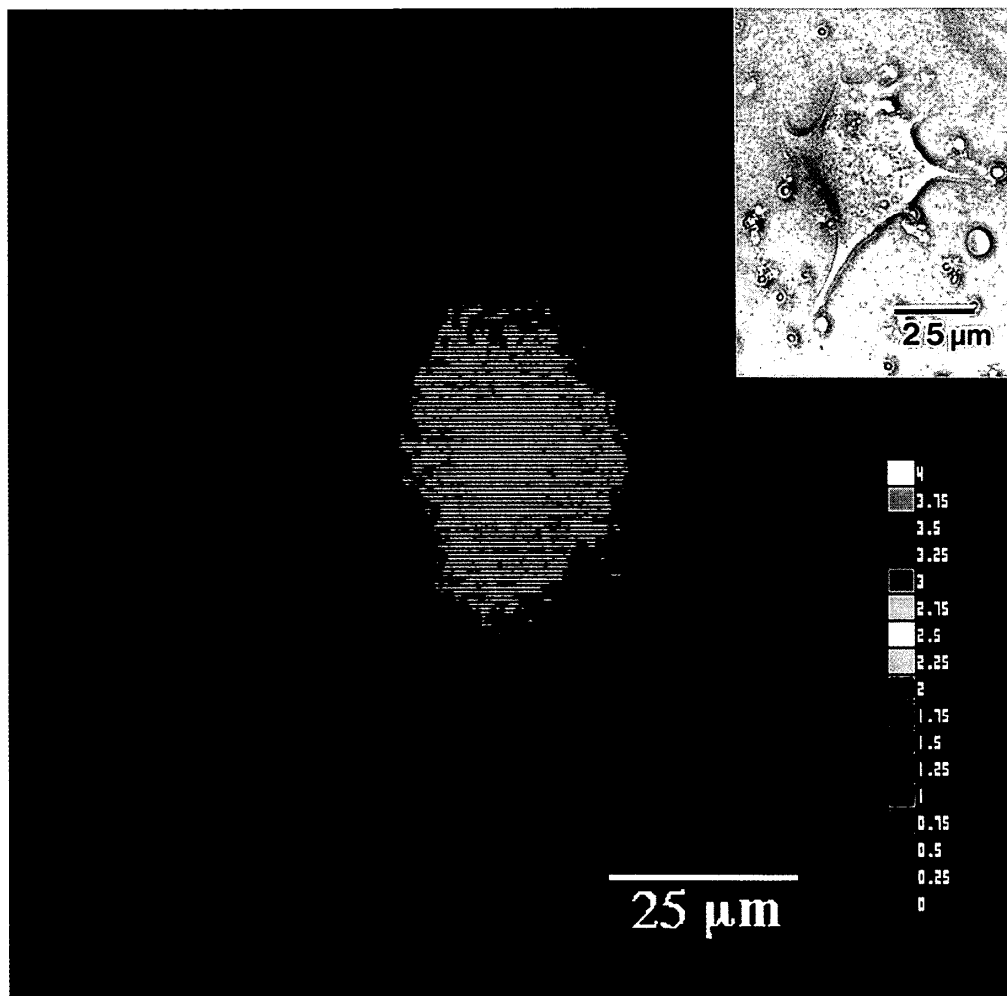


第3図 水平細胞の細胞内 pH 調節

細胞外液を正常リンガー液から Na^+ -欠如リンガー液に交換すると、細胞内 pH は約0.12下降 (酸性化) した。次に、amiloride (1 mM) を正常リンガー液に添加し投与すると、細胞内は約0.13程度酸性化した。いずれの場合にも、細胞外液を正常リンガー液に戻すと、細胞内 pH は元のレベルに回復した。続けて、アンモニウムリンガー液を灌流すると、水平細胞はアルカリ化し、これを正常リンガー液に戻すと、直ちに酸性化した。酸性化からの回復途中 amiloride (1 mM) を投与すると、細胞内 pH の回復は一時的に抑えられた。Amiloride を除去すると回復は再開し、約26分後には元の pH レベルに戻った。再度、アンモニウムリンガー液を灌流した。酸性化からの回復の途中、正常リンガー液から Na^+ を除去 (Na^+ -欠如リンガー液の灌流) すると、回復は抑えられた。この結果は、水平細胞に Na^+/H^+ エクステンジャーが発現していることを示している。

した。いずれの場合にも、細胞外液を正常リンガー液に戻すと、細胞内 pH は元のレベルに回復した。続けて、アンモニウムリンガー液を灌流すると、水平細胞はアルカリ化し、これを正常リンガー液に戻すと、急速に酸性化した（約 0.5 pH ユニット）。酸性化からの回復途中、amiloride (1 mM) を投与すると、pH の回復は一時的に抑えられた。Amiloride を除去すると回復は再開し、約26分後には元の pH レベルに戻った。再度、アンモニウムリンガー液を灌流した。酸性化からの回復の途中、リンガー液の Na^+ を除去すると、回復は抑えられた。

Na^+/H^+ エクスチェンジャーが水平細胞膜にどのように分布しているのかを調べるため、BODIPY FL amiloride を灌流する実験を実施した。第 4 図の結果は、細胞全体に Na^+/H^+



第 4 図 水平細胞膜に発現する Na^+/H^+ エクスチェンジャーの分布

BODIPY FL amiloride ($2.5 \mu\text{M}$) を含むリンガー液中に水平細胞を約 5 分間放置し、495 nm の単色光を細胞に照射した。水平細胞膜に発現する Na^+/H^+ エクスチェンジャーへの BODIPY FL amiloride の結合に伴う蛍光が観察された。細胞内 pH 記録に用いたシステムを用いて、この蛍光を擬似カラーで表示した。右上には、この水平細胞の位相差顕微鏡像を示した。この結果は、 Na^+/H^+ エクスチェンジャーが水平細胞膜に一様に発現していることを示唆している。

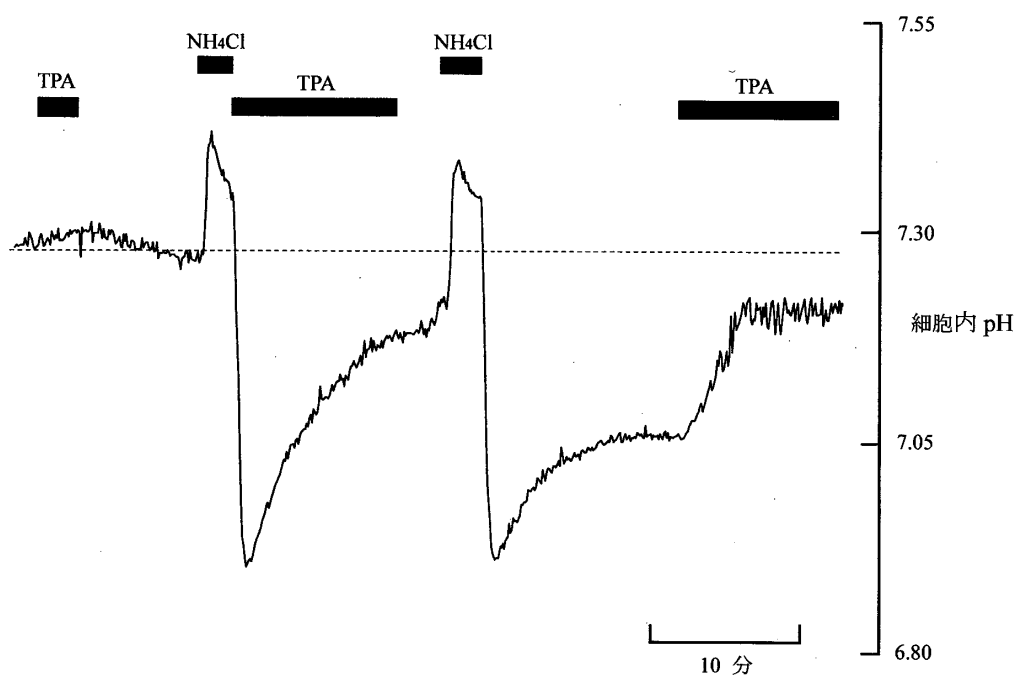
エキスチェンジャーが発現していることを示している。

以上の結果は、水平細胞膜に均一に Na^+/H^+ エクスチェンジャーが発現し、細胞内 pH 調節に関与していることを示唆している。

プロテインキナーゼ C による Na^+/H^+ エクスチェンジャーの修飾

Na^+/H^+ エクスチェンジャーは、細胞内セカンドメッセンジャー系を介する調節を受けている (Burckhardt *et al.*, 2002)。本研究では、アメリカナマズ網膜水平細胞に発現する Na^+/H^+ エクスチェンジャーがプロテインキナーゼ C による修飾を受けているのか否かを検討するため、プロテインキナーゼ C 活性化剤である Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) およびプロテインキナーゼ C 阻害剤である N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide hydrochloride (H-8) を投与し、細胞内 pH への影響を調べた。

正常リンガー液に TPA (30 μM) を添加し投与すると、静止時の水平細胞内 pH は上昇 (0.01~0.03 pH ユニット) した (第 5 図)。このアルカリ化の平均は、 0.021 ± 0.006 ($n=7$) であった。TPA の効果は可逆的で、洗い流すと元の pH レベルへと回復した。次に、TPA が



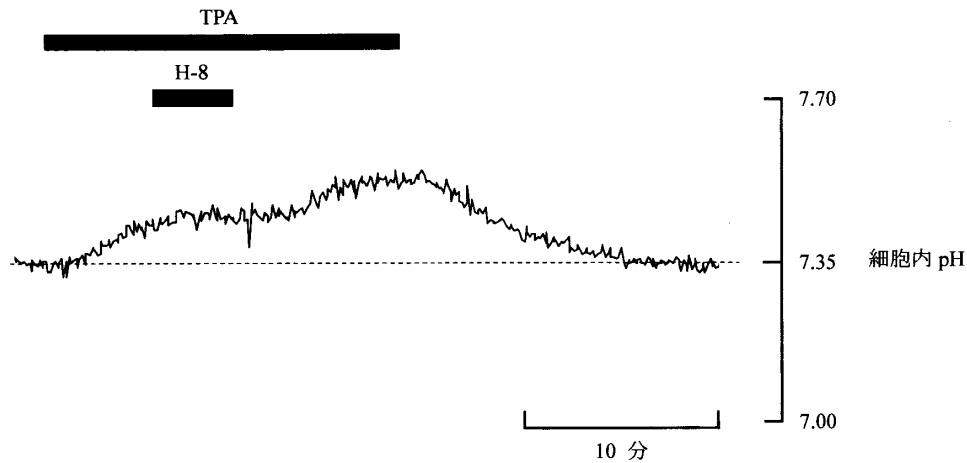
第 5 図 プロテインキナーゼ C の活性化が水平細胞の細胞内 pH に及ぼす影響

正常リンガー液にプロテインキナーゼ C の活性化剤である Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA; 1 μM) を添加し投与すると、静止時の水平細胞内 pH は約 0.02 pH ユニット上昇した。TPA の効果は可逆的であり、洗い流すと元の pH に回復した。次に、TPA がアンモニウムリンガー液灌流後に発生する酸性化からの回復過程に及ぼす効果について調べた。第 2 回目のアンモニウムリンガー液灌流では、酸性化からの回復途中に TPA を投与した。TPA の投与により、細胞内 pH の回復が顕著に促進された。この結果は、プロテインキナーゼ C が Na^+/H^+ エクスチェンジャーを修飾していることを示唆している。

アンモニウムリンガー液灌流後に発生する酸性化からの回復過程に及ぼす効果について調べた。第2回目のアンモニウムリンガー液灌流では、TPAを酸性化からの回復途中に投与した。TPAの投与により、細胞内pHの回復が顕著に促進された。

TPAがプロテインキナーゼCを介して Na^+/H^+ エクスチェンジャーの活性に影響していることを確認するため、プロテインキナーゼCの阻害剤であるH-8の効果を調べた(第6図)。TPA(1 μM) 投与により水平細胞がアルカリ化している途中に、H-8(30 μM) を投与した。H-8はTPAによるアルカリ化を抑制し、これを洗い流すと再びアルカリ化に転じた。

以上の結果は、水平細胞の Na^+/H^+ エクスチェンジャーがプロテインキナーゼCによる修飾を受けていることを示唆している。



第6図 プロテインキナーゼCによる Na^+/H^+ エクスチェンジャーの修飾

水平細胞に Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA; 1 μM) 投与すると、アルカリ化した。アルカリ化中に、N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide hydrochloride (H-8; 30 μM) を投与した。H-8は、TPA投与によりアルカリ化を一時的に抑制した。H-8を洗い流すと、再びアルカリ化に転じた。この結果は、水平細胞の Na^+/H^+ エクスチェンジャーがプロテインキナーゼCによる修飾を受けていることを示唆している。

考 察

水平細胞の機能

①剥離網膜あるいは眼盃網膜にガラス管微小電極法を適用した電気生理学的研究、②電子顕微鏡技術を駆使した形態学的研究、③網膜から単離・培養した神経細胞あるいはスライス網膜標本にパッチクランプ法やイメージング法を適用した生物物理学および神経薬理学的研究、そして④分子生物学的、免疫細胞学的および免疫組織学手法を網膜に適用した研究から、拮抗的受容野形成並びに色覚の初期過程形成に視細胞、双極細胞と水平細胞のシナプス連絡が関与していることが明らかとなっている(第1図参照)。特に、水平細胞から視細胞へ

の負のフィードバックシナプスが拮抗的受容野の周辺部応答形成並びに三原色説過程から反対色説過程への変換に重要であると考えられている (Werblin & Dowling, 1969; Stell *et al.*, 1975; Burkhardt, 1977; Burkhardt & Hassin, 1978; Toyoda & Tonosaki, 1978; Murakami *et al.*, 1982a, b; Witkovsky *et al.*, 1995)。

水平細胞内の水素イオン濃度調節

これまで細胞内外の水素イオン濃度 (pH) は、生体の持つホメオスタシス機能により殆ど変化しないと考えられてきた。しかし、短期的には変動を繰り返しており、この pH 変動が生体の諸機能に影響する例 (細胞分裂, 細胞分化あるいは受精など) が知られている。神経系では、化学シナプスの活性化が細胞内外の pH に影響すること、さらにこの細胞内外の pH 変化が神経機能 (リガンド受容体やイオンチャネルの活性) に影響することが知られている (例えば, Moody, 1984; Chesler & Kaila, 1992; Kaila, 1994)。著者らも、細胞内水素イオン (おそらく、水素イオンは細胞内セカンドメッセンジャーとして機能している) が水平細胞のカルシウムチャネル, 内向き整流性カリウムチャネルやヘミギャップ結合チャネルの活性を制御していることを見出した (Dixon *et al.*, 1993, 1996; Takahashi *et al.*, 1993; Takahashi & Copenhagen, 1995)。

細胞外の pH 調節に関しては古くから研究が行われ、多くの知見が蓄積している。しかし、細胞内 pH の測定は技術的に困難であったため、十分な研究は行われていなかった。pH 感受性蛍光色素が開発されて以降、細胞内 pH 測定は比較的容易になり、研究は増加の一途を辿っている (例えば, Paradiso *et al.*, 1987a, b)。網膜でも、視細胞および水平細胞の細胞内 pH 調節に関する研究が既に行われている (Katz & Oakley, 1990; Saarikoski *et al.*, 1997; Haugh-Scheidt & Ripps, 1998; Krizaj & Copenhagen, 1998; 高橋, 2002)。本研究では、水平細胞の細胞内 pH 調節機構を調べ、 Na^+/H^+ エクスチェンジャーが発現していることを見出した。この結果は、Haugh-Scheidt & Ripps (1998) によるエイ網膜水平細胞の細胞内 pH 調節が Na^+/H^+ エクスチェンジャーによるという報告を支持している。本研究では、さらに、 Na^+/H^+ エクスチェンジャーが水平細胞表にほぼ均一に分布していること、およびプロテインキナーゼ C による制御を受けていることを明らかにした。

細胞内では、エネルギーの消費を伴うプロセスが休むことなく進行している。特に、細胞の生理機能の維持のために、 Na^+/K^+ ポンプが継続的に機能し、細胞内に K^+ を汲み入れそして細胞外に Na^+ を排出している。このポンプは濃度勾配に逆らってそれぞれのイオンを交換輸送するため、生体エネルギーである ATP を消費している。ATP を産生する際、副産物として細胞内に H^+ が増えるため細胞内は酸性化する。この酸性化を防ぐため、 Na^+/H^+ エクスチェンジャーが機能し、細胞内の H^+ を積極的に細胞外に排出している。水平細胞でも、細胞

内 pH を調整するために細胞膜に均一に発現した Na^+/H^+ エクスチェンジャーが働いていると考えられる。本実験ではこのエクスチェンジャーのプロテインキナーゼ C による制御の可能性を見出したが、この生理学的意味については未だ不明である。今後、この修飾の機能を解明すると共に、他の細胞内セカンドメッセンジャーによる制御について調べると同時に、 $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ エクスチェンジャーや $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ポンプによる細胞内 pH 調節についても検討する必要がある。

引用文献

- Attwell, D. (1986), Ion channels and signal processing in the outer retina, *Quart. J. Exp. Physiol.*, **71**: 497–536.
- Attwell, D., Mobbs, P., Tessier-Lavigne, M. and Wilson, M. (1987), Neurotransmitter-induced currents in retinal bipolar cells of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*, *J. Physiol. (Lond.)*, **387**: 130–161.
- Ayoub, G. S., Korenbrot, J. and Copenhagen D. R. (1989), Release of endogenous glutamate from isolated cone photoreceptors of the lizard, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 10**: 47–57.
- Bader, C. R., Macleish, P. R. and Schwartz, E. A. (1979), A voltage clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander, *J. Physiol. (Lond.)*, **296**: 1–26.
- Baldrige, W. H., Ball, A. K. and Miller, R. C. (1987), Dopaminergic regulation of horizontal cell gap junction particle density in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **265**: 428–436.
- Baldrige, W. H., Vaney, D. I. and Weiler, R. (1998), The modulation of intracellular coupling in the retina, *Sem. Cell Develop. Biol.*, **9**: 311–318.
- Barnes, S. (1994), After transduction: Response shaping and control of transmission by ion channels of the photoreceptors inner segment, *Neuroscience*, **3**: 447–459.
- Burkhardt, D. A. (1977), Responses and receptive-field organization of cones in perch retinas, *J. Neurophysiol.*, **40**: 53–62.
- Burkhardt, D. A. and Hassin G. (1978), Influences of cones upon chromatic- and luminosity-type horizontal cells in pikeperch retinas, *J. Physiol. (Lond.)*, **281**: 125–137.
- Burckhardt, G., Di Sole, F. and Helmle-Kolb, C. (2002), The Na^+/H^+ exchanger gene family, *J. Nephrol.*, **15** (Suppl. 5): S3-S21.
- Chesler, M. and Kaila, K. (1992), Modulation of pH by neuronal activity, *Trends Neurosci.*, **15**: 396–402.
- Chino, Y. M. and Hashimoto, Y. (1986), Dopaminergic amacrine cells in the retina of Japanese dace, *Brain Res.*, **372**: 323–337.
- Cleland, B. G. and Harding, T. H. (1983), response to the velocity of moving visual stimuli of the brisk classes of ganglion cells in the cat retina, *J. Physiol.*, **345**: 47–63.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536–539.
- Davis, G. W. and Naka, K.-I. (1980), Spatial organization of catfish retinal neurons: I. Single- and random-bar stimulation, *J. Neurophysiol.*, **43**: 807–831.
- Daw, N. W. (1973), Neurophysiology of color vision, *Physiol. Rev.*, **53**: 571–611.
- Daw, N. W., Brunken, W. J. and Parkison, D. (1989), The function of synaptic transmitters in the retina, *Ann. Rev. Neurosci.*, **12**: 205–225.
- Dixon, D. B., Takahashi, K.-I. and Copenhagen, D. R. (1993), Glutamate suppresses HVA calcium currents in catfish horizontal cells by raising intracellular proton concentration, *Neuron*, **11**: 267–277.
- Dixon, D. B., Takahashi, K.-I., Bieda, M. and Copenhagen, D. R. (1996), Quinine, intracellular pH and modulation of hemi-gap junctions in catfish horizontal cells, *Vision Res.*, **36**: 3925–3931.
- Djamgoz, M. B. A., Spadavecchia, L., Usai, C. and Vallergera, S. (1990), Variability of light-evoked response

- pattern and morphological characterization of amacrine cells in goldfish retina, *J. Comp. Neurol.*, **301**: 171–190.
- Fain, G. L. and Quandt, F. N. (1980a), The effects of tetraethylammonium and cobalt ions on responses to extrinsic current in the toad rods, *J. Physiol. (Lond.)*, **303**: 515–533.
- Fain, G. L., Gerschenfeld, H. M. and Quandt, F. N. (1980b), Calcium spikes in the toad rods, *J. Physiol. (Lond.)*, **303**: 495–513.
- Fain, G. L., Quandt, F. N., Bastian, B. L. and Gerschenfeld, H. M. (1978a), Contribution of a caesium sensitive conductance increase to the rod photoreceptors, *Nature*, **272**: 467–469.
- Fain, G. L., Quandt, F. N. and Gerschenfeld, H. M. (1978b), Calcium-dependent regenerative responses in rods, *Nature*, **269**: 707–710.
- Gouras, P. (1972), S-potential. Physiology of photo-receptor organ, In *Handbook of sensory physiology* Vol. VII/2, Springer-Verlag, Berlin, pp 513–529.
- Grinvald, A., Frostig, R. D., Liebe, E. and Hildesheim, R. (1988), Optical imaging of neuronal activity, *Physiol. Rev.*, **68**: 1285–1366.
- 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.
- Hampson, E. C. G. M., Vaney, D. I. and Weiler, R. (1992), Dopaminergic modulation of gap junction permeability between amacrine cells in mammalian retina, *J. Neurosci.*, **12**: 4911–4922.
- Haugh-Scheidt, L. and Ripps, H. (1998), pH regulation of horizontal cells of the skate retina, *Exp. Eye Res.*, **66**: 449–464.
- Haynes, L. W. and Yaw, K.-W. (1985), Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones, *Nature*, **317**: 61–64.
- Hidaka, S., Maehara, M., Umino, O., Lu, Y. and Hashimoto, Y. (1993), Lateral gap junction connections between retinal amacrine cells summing sustained responses, *Neuroreport*, **5**: 29–32.
- Kaila, K. (1994), Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system, *Prog. Neurobiol.*, **42**: 489–537.
- Kaneko, A. (1970), Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **207**: 623–633.
- Kaneko, A. (1971), Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **213**: 95–105.
- Kaneko, A. (1973), Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **235**: 133–153.
- Kaneko, A. (1979), Physiology of the retina, *Ann. Rev. Neurosci.*, **2**: 169–191.
- Kaneko, A. (1983), Retinal bipolar cells: their function and morphology, *Trends Neurosci.*, **6**: 219–223.
- Kaneko, A. and Saito, T. (1983), Ionic mechanisms underlying the responses of off-center bipolar cells in the carp retina: II. Studies on responses evoked by transretinal current stimulation, *J. Gen. Physiol.*, **81**: 603–612.
- Kaneko, A. and Shimazaki, H. (1976), Synaptic transmission from photoreceptors to bipolar and horizontal cells in the carp retina, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **40**: 537–546.
- Kaneko, A. and Tachibana, M. (1982), Retinal bipolar cells with double colour-opponent receptive field, *Nature*, **293**: 220–222.
- Kawamura, S. (1993), Molecular aspects of photoreceptor adaptation in vertebrate retina, *Int. Rev. Neurobiol.*, **35**: 43–86.
- Kawamura, S. (1994), Photoreceptor light-adaptation mediated by S-modulin, a member of a possible regulatory protein family of protein phosphorylation in signal transduction, *Neurosci. Res.*, **20**: 293–298.
- Katz, B. J. and Oakley, B. (1990), Evidence for Na⁺/H⁺ exchanger in vertebrate rod photoreceptors, *Exp. Eye Res.*, **51**: 199–207.
- Krizaj, D. and Copenhagen, D. R. (1998), Compartmentalization of calcium extrusion mechanisms in the outer and inner segments of photoreceptors, *Neuron*, **21**: 249–256.
- 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. USA, **79**: 936–940.
- Massey, S. C. and Redburn, D. A. (1987), Transmitter circuits in the vertebrate retina, Prog. Neurobiol., **28**: 55–96.
- Miller, A. M. and Schwartz, E. A. (1983), Evidence for the identification of synaptic transmitters released by photoreceptors of the toad retina, J. Physiol. (Lond.), **334**: 325–349.
- Moody, W. Jr. (1984), Effects of intracellular H^+ on the electrical properties of excitable cells, Ann. Rev. Neurosci., **7**: 257–278.
- 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. (Lond.), **386**: 165–180.
- Murakami, M., Miyachi, E.-I. and Takahashi, K.-I. (1995), Modulation of gap junctions between horizontal cells by second messengers, Prog. Ret. Eye Res., **14**: 197–221.
- Murakami, M., Otsu, K. and Otsuka, T. (1972), Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina, J. Physiol. (Lond.), **227**: 899–913.
- Murakami, M., Ohtsuka, T. and Shimazaki, H. (1975), Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina. Vision Res., **15**: 456–458.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982a), GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina, Jpn. J. Physiol., **32**: 911–926.
- Murakami, M., Shimoda, Y., Nakatani, K., Miyachi, E.-I. and Watanabe, S.-I. (1982b), GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina, Jpn. J. Physiol., **32**: 927–935.
- 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. (Lond.), **386**: 165–180.
- Murakami, M. and Takahashi, K.-I. (1988), Calcium action potentials in retinal cells of the carp, Neurosci. Res., **Suppl. 8**: 137–149.
- Murakami, M., Miyachi, E.-I. and Takahashi, K.-I. (1995), Modulation of gap junctions between horizontal cells by second messengers, Prog. Ret. Eye Res., **14**: 197–221.
- Naka, K.-I. and Christensen, B. (1981), Direct electrical connections between transient amacrine cells in the catfish retina, Science, **214**: 462–464.
- Naka, K.-I. and Rushton, W. A. H. (1967), The generation and spread of S-potentials in fish (*Cyprinidae*), J. Physiol. (Lond.), **192**: 437–461.
- Naka, K.-I. and Witkovsky, P. (1972), Dogfish ganglion cell discharge resulting from extrinsic polarization of the horizontal cells. J. Physiol. (Lond.), **223**: 449–460.
- Nawy, S. and Jahr, C. E. (1990), Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells, Nature, **346**: 269–271.
- Nawy, S. and Jahr, C. E. (1991), cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter, Neuron, **7**: 677–683.
- Nelson, R. and Kolb, H. (1983), Synaptic patterns and response properties of bipolar and ganglion cells in the cat retina, Vision Res., **23**: 1183–1195.
- Paradiso, A. M., Tsien, R. Y. and Machen, T. E. (1987a), Digital image processing of intracellular pH in gastric oxyntic and chief cells. Nature, **325**: 447–450.
- Paradiso, A. M., Tsien, R. Y., Demarest, J. R. and Machen, T. E. (1987b), Na-H and Cl-HCO₃ exchange in rabbit oxyntic cells using fluorescence microscopy. Am. J. Physiol., **253**: C30–C36.
- Picones, A. and Korenbrot, J. I. (1994), Analysis of fluctuations in the cGMP-dependent currents of cone photoreceptor outer segments, Biophys. J., **66**: 360–365.
- Pugh, E. N. Jr. and Lamb, T. D. (1990), Cyclic GMP and calcium: The internal messengers of excitation and adaptation in vertebrate photoreceptors, Vision Res., **30**: 1923–1948.
- Pugh, E. N. Jr. and Lamb, T. D. (1993), Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction, Biochim. Biophys. Acta, **1141**: 111–149.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982a), Hyperpolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid neurotransmitter antagonists, Neurosci. Lett., **30**: 251–256.
- Rowe, J. S. and Ruddock, K. H. (1982b), Depolarization of retinal horizontal cells by excitatory amino acid

- neurotransmitter agonists, *Neurosci. Lett.*, **30**: 257–262.
- Saarikoski, J., Ruusuvuori, E., Koskelainen, A. and Donner, K. (1997), Regulation of intracellular pH in salamander retinal rods, *J. Physiol. (Lond.)*, **498.1**: 61–72.
- Saito, T. (1987), Physiological and morphological differences between on- and off-center bipolar cells in the vertebrate retina, *Vision Res.*, **27**: 135–142.
- Saito, T. and Kaneko, A. (1983), Ionic mechanisms underlying the responses of off-center bipolar cells in the carp retina: I. Studies on responses evoked by light, *J. Gen. Physiol.*, **81**: 589–601.
- Saito, T. and Kujiraoka, T. (1982), Physiological and morphological identification of two types of on-center bipolar cells in the carp retina, *J. Comp. Neurol.*, **205**: 161–170.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1978), Rod and cone signals in the on-center bipolar cells: Their different ionic mechanisms, *Vision Res.*, **18**: 591–595.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1979a), Ionic mechanisms of two types of on-center bipolar cells in the: I. The responses to central illumination, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 73–90.
- Saito, T., Kondo, H. and Toyoda, J.-I. (1979b), Ionic mechanisms of two types of on-center bipolar cells in the: II. The responses to annular illumination, *J. Gen. Physiol.*, **73**: 569–589.
- Saito, T., Kujiraoka, T. and Toyoda, J. (1984), Electrical and morphological properties of Off-center bipolar cells in the carp retina, *J. Comp. Neurol.*, **222**: 200–208.
- Sasaki, T. and Kaneko, A. (1996), L-Glutamate-induced responses in Off-type bipolar cells of the cat retina, *Vision Res.*, **36**: 787–795.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1990), Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **242**: 91–94.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1992a), The glutamate-receptor linked cGMP cascade of the retinal on-bipolar cells is pertussis and cholera toxin-sensitive, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **247**: 17–20.
- Shiells, R. A. and Falk, G. (1992b), Properties of the cGMP-activated channel of retinal on-bipolar cells, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **247**: 21–25.
- Shiells, R. A., Falk, G. and Naghshineh, S. (1981), Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells, *Nature*, **294**: 592–594.
- Shingai, R. and Christensen, B. N. (1983), Sodium and calcium currents measured in isolated catfish horizontal cells under voltage clamp, *Neuroscience*, **10**: 839–897.
- Shingai, R. and Christensen, B. N. (1986), Excitable properties and voltage-sensitive ion conductances of horizontal cells isolated from catfish (*Ictalurus punctatus*), *J. Neurophysiol.*, **56**: 32–49.
- Slaughter, M. M. and Miller R. F. (1981), 2-amino-4-phosphonobutyric acid: A new pharmacological tool for retinal research, *Science*, **211**: 182–185.
- Stein, A., Mullikin, W. and Stevens, J. (1983), The spatiotemporal building blocks of X-, Y- and W-ganglion cell receptive fields of the cat's retina, *Exp. Brain Res.*, **49**: 341–352.
- 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), Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses, *Science*, **190**: 989–990.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **321**: 141–161.
- Tachibana, M. (1983), Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **345**: 329–351.
- Takahashi, K.-I. (1986), Ion channels in *in situ* rod of the frog retina as revealed by intracellular current injection, *Keio Journal of Medicine*, **35**: 162–179.
- 高橋恭一 (2000), アメリカナマズ網膜から単離した水平細胞の形態変化, *経済科学研究*, **4**(1): 77–99.
- 高橋恭一 (2002), トラフサンショウウオ網膜錐体の細胞内 pH 調節, *経済科学研究*, **6**(1): 205–215.
- Takahashi, K.-I. and Copenhagen, D. R. (1995), Intracellular alkalinization enhances inward rectifier K⁺ current in retinal horizontal cells of catfish, *Zool. Sci.*, **12**: 29–34.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M. (1988), Subtype of excitatory amino acid receptor in cone horizontal cells

- of the carp retina as specified by reversal potential measurement technique, *Neurosci. Res.*, **5**: 453–464.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M. (1987), Reversal potentials of rod horizontal cells in the carp retina, *Neurosci. Res.*, **Suppl. 6**: 165–174.
- Takahashi, K.-I. and Murakami, M. (1991), Reversal potentials of color opponent responses in horizontal cells of the carp retina, *Vision Res.*, **31**: 1159–1165.
- Takahashi, K.-I., Dixon, D. B. and Copenhagen, D. R. (1993), Modulation of a sustained calcium current by intracellular pH in horizontal cells of fish retina, *J. Gen. Physiol.*, **101**: 695–714.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S. and Kaneko, A. (1994), Two components of GABA-induced currents in catfish retinal horizontal cells, *Jpn. J. Physiol.*, **44 (Suppl. 2)**: 141–144.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S. and Kaneko, A. (1995a), GABA-induced chloride current in catfish horizontal cells mediated by non-GABA_A receptor channels, *Jpn. J. Physiol.*, **45**: 437–456.
- Takahashi, K.-I., Miyoshi, S., Kaneko, A. and Copenhagen, D. R. (1995b), Actions of nipecotnic acid and SKF89976A on GABA transporter in cone-driven horizontal cells dissociated from the catfish retina, *Jpn. J. Physiol.*, **45**: 457–473.
- Teranishi, T., Negishi, K. and Kato, S. (1984), Regulatory effect of dopamine on spatial properties of horizontal cells in carp retina, *J. Neurosci.*, **4**: 1271–1280.
- Teranishi, T., Negishi, K. and Kato, S. (1987), Functional and morphological correlates of amacrine cells in carp retina, *Neurosci.*, **20**: 935–950.
- Tomita, T. (1963), Electrical activity in the vertebrate retina, *J. Opt. Soc. Amer.*, **53**: 49–57.
- Tomita, T. (1965), Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 559–566.
- Toyoda, J.-I. and Tonosaki, K. (1978), Effect of polarization of horizontal cells on the on-centre bipolar cell of carp retina, *Nature*, **276**: 399–400.
- Trifonov, Yu. A. (1968), Study of synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells by means of electrical stimulation of the retina, *Biofizika*, **13**: 809–817.
- Vaney, D. I. (1991), Many diverse type of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin and neurobiotin, *Neurosci. Lett.*, **125**: 187–190.
- Vaney, D. I. (1993), The coupling pattern of axon-bearing horizontal cells in the mammalian retina, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **252**: 93–101.
- 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.
- Wässle, H. and Boycott, B. B. (1991), Functional architecture of the mammalian retina, *Physiol. Rev.*, **71**: 447–480.
- Watanabe, S.-I. and Murakami, M. (1991), Similar properties of cGMP-activated channels between cones and rods in the carp retina, *Vis. Neurosci.*, **6**: 563–568.
- Werblin, F. S. and Dowling, J. E. (1969), Organization of the retina the the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording, *J. Neurophysiol.*, **32**: 339–355.
- Witkovsky, P., 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. USA*, **92**: 3556–3560.
- Yamada, E. and Ishikawa, T. (1965), The fine structure of the horizontal cells in some vertebrate retinae, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **30**: 383–392.
- Yamashita, M. and Wässle, H. (1991), Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphnbutyric acid (APB), *J. Neurosci.*, **11**: 2372–2382.
- Yang, C. Y., Lukasiewicz, P., Maguire, G., Werblin, F. S. and Yazzula, S. (1991), Amacrine cells in the tiger salamander retina: Morphology, physiology, and neurotransmitter identification, *J. Comp. Neurol.*, **312**: 19–32.