

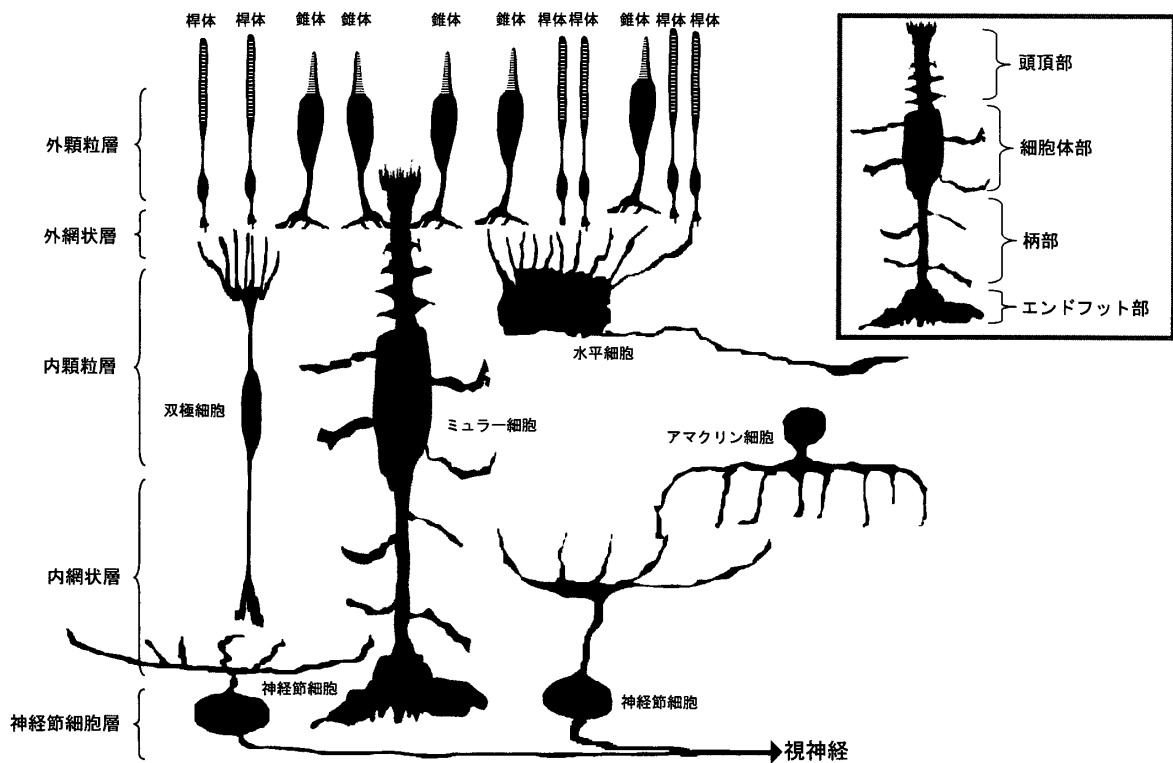
# Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> エクスチェンジャーによるトランプサンショウウオ 網膜ミュラー細胞の細胞内 pH 調節

高橋 恭一  
(受付 2003 年 5 月 9 日)

## 序論

脳や脊髄のような神経組織において、神経細胞ならびにシナプスが正常に活動するには、細胞外の各種イオン（ナトリウムイオン [Na<sup>+</sup>], カリウムイオン [K<sup>+</sup>], クロライドイオン [Cl<sup>-</sup>], カルシウムイオン [Ca<sup>2+</sup>], マグネシウムイオン [Mg<sup>2+</sup>], 重炭酸イオン [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>], 水素イオン [H<sup>+</sup>] など）、ならびに各種化学物質（アスパラギン酸, グルタミン酸, グルタミン, グリシン,  $\gamma$ -アミノ酪酸 [GABA], アセチルコリン, セロトニン, ドーパミン, エンケファリン, コレシストキニン, サブスタンス P, ソマトスタチンなど）の濃度が生理的範囲内に保持されている必要がある。最近の研究によると、これらの物質の神経組織内での濃度は必ずしも一定でなく、神経活動やシナプス活動に伴い時々刻々変化（例えば、シナプス間隙のグルタミン酸濃度や GABA 濃度の変化、および細胞外の K<sup>+</sup> 濃度や H<sup>+</sup> 濃度の変化）することが報告されている（例えば、Chesler & Kaila, 1992; Kaila, 1994）。このような短期的な物質濃度変化を最小限に抑え且つ速やかに生理的範囲内に回復するため、さらには神経組織内の長期的な物質環境を調節・維持し、神経細胞に各種の栄養素を補給するため、神経組織内に存在するグリア細胞が重要な役割を果たしていることは周知である（例えば、Brew & Attwell, 1987; Schwartz & Tachibana, 1990）。

脊椎動物の感覚系の中で、視覚が唯一中枢神経由来の神経組織である。このため、網膜は古くから脳機能解析の好個の材料として実験に用いられてきた。網膜には、光受容とその後の情報処理を担う 5 種類の神経細胞（視細胞, 双極細胞, 水平細胞, アマクリン細胞と神経節細胞）とグリア細胞の一種であるミュラー細胞が存在する（第 1 図参照）（例えば、Newman & Reichenbach, 1996）。視細胞は光感受性を有し、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、縦方向に配置した神経細胞群（視細胞, 双極細胞と神経節細胞）と横方向に配置した神経細胞群（水平細胞およびアマクリン細胞）による情報処理を経て、脳に伝播され視覚を生む。ミュラー細胞には、グルタミン酸トランスポーターや GABA トランスポーター（細胞外に放出された神経伝達物質の除去）、また Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 共輸送体（ミュラー細胞内外の H<sup>+</sup> 濃度調節）、各種イオンチャネル（カル



第1図 脊椎動物網膜の細胞構築とミュラー細胞の配置

脊椎動物網膜は、5種類の神経細胞（視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞と神経節細胞）とミュラー細胞（グリア細胞の1種）からなる。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（特徴抽出）に当たる。視細胞は、光に対して感受性の高い桿体（薄明視）と低い錐体（昼光視）に分類される。視細胞で受容された明暗情報（光環境の変化）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、脳にまで伝播される。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、その結果が視神経（神経節細胞の軸索）を経て脳に達する。ミュラー細胞は神経活動やシナプス活動（光受容や視覚情報処理）の調節・維持、ならびに神経細胞への栄養供給の役割を担っていると考えられている。挿入図には、ミュラー細胞の各部の名称を示した。

シウムチャンネルやカリウムチャンネルなど）やりガンド依存性レセプター（グルタミン酸レセプターや GABA レセプター）（ミュラー細胞の膜電位調整）が発現し、またミュラー細胞内には炭酸脱水素酵素、グルタミン合成酵素や cyclic Adenine 3', 5'-monophosphate (cAMP) 系などが存在し、網膜内での視覚情報処理（神経活動およびシナプス活動）に支障をきたさないように働いている（Riepe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979; Newman, 1987, 1991, 1994, 1995, 1996, 1999; Schwartz, 1993; Brecha & Weigmann, 1996; Johnson *et al.*, 1996; Eliasof *et al.*, 1998a, b; Bringmann *et al.*, 2000; Pannicke *et al.*, 2000）。

最近、細胞内外の  $H^+$  がイオンチャンネルやシナプスレセプター（シナプス後膜に発現するリ

グンド依存性レセプター) を修飾する因子として機能している可能性が報告され、注目を集めている。この可能性を検討すべく、多くの研究者が細胞内外の H<sup>+</sup> による神経活動およびシナプス活動の修飾のみならず神経細胞内外の H<sup>+</sup> 濃度 (pH) の調節に関する実験を進めている (例えば, Moody, 1984; Chesler & Kaila, 1992; Kaila, 1994; Burckhardt *et al.*, 2002)。著者らも、これまでに下等脊椎動物の網膜を材料に、視細胞と水平細胞の細胞内 pH 調節、および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およびヘミギャップ結合チャネルの細胞内 H<sup>+</sup> による修飾などを見出し、これらを報告してきた (Dixon *et al.*, 1993, 1996; Takahashi *et al.*, 1993; Takahashi & Copenhagen, 1995; 高橋, 2002, 2003)。著者ら以外にも、視細胞や水平細胞の pH に関する研究は比較的よく行われている (例えば, Katz & Oakley, 1990; Saarikoski *et al.*, 1997; Haugh-Scheidt & Ripps, 1998)。しかし、双極細胞、アマクリン細胞そして神経節細胞の pH 調節ならびに H<sup>+</sup> によるこれら細胞の機能修飾に関する研究については、未だ緒についていない。網膜内の神経細胞とシナプスの機能調節と維持のために最も重要と考えられているミュラー細胞では、細胞内外の pH 調節に Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 共輸送体が関与していることが Newman (1987, 1991, 1994, 1995, 1996, 1999) により報告されているが、他の pH 調節系に関する研究は殆ど実施されていない。

本研究では、トラフサンショウウオ網膜から単離したミュラー細胞の細胞内 pH 調節機構を細胞内 pH 測定法により調べ、①ミュラー細胞に Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> エクスチェンジャーが発現し、②このエクスチェンジャーが静止時の細胞内 H<sup>+</sup> 濃度調整に関与していることを見出したので報告する。

## 実験材料と方法

実験には、体長約 25 cm~35 cm の幼生期のトラフサンショウウオ (*Ambystoma tigrinum*) を用いた。Tachibana (1981) の方法に従い、網膜からミュラー細胞を単離した。以下に単離法を概説する。低温麻酔したトラフサンショウウオを断頭し、直ちに脳および脊髄の両側を穿刺した後、両眼球を摘出した。前眼部、水晶体および硝子体を除去した後、網膜を剥離した。剥離網膜を Papain 処理した後、剃刀を用いて約 2 mm 角の細片に切断した。この網膜細片を 100 μl のピペットマンに装着したイエローチップ内を出し入れすることにより、単離細胞を得た。単離したミュラー細胞を含む懸濁液を Concanavalin A を塗布した円型 (直径 12 mm) のカバーガラス上に置き、細胞がカバーガラスに付着したのを確認後、このカバーガラスを倒立顕微鏡 (TMD, Nikon) に装着した記録槽内に移動し、実験を開始した。細胞から 200 μm~300 μm の距離に置いた Y-tube (直径 150 μm) を用いて、リンガー液を常時灌流した。

トランプサンショウウオの正常リンガー液の組成は、97.0 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 2.0 mM 塩化カリウム (KCl), 2.0 mM 塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ ), 2.0 mM 塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ ), 1.0 mM ピルビン酸ナトリウム, 0.3 mM アスコルビン酸, 0.5 mM グルタチオン, 15.0 mM ブドウ糖, 10.0 mM *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) であった。細胞内 pH を強制的に変化させるため、20 mM の NaCl を塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) に置換し用いた (アンモニウムリンガー液)。リンガー液中の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  はアンモニウムイオン ( $\text{NH}_4^+$ ) と  $\text{Cl}^-$  に解離する。さらに、 $\text{NH}_4^+$  はアンモニア ( $\text{NH}_3$ ) と  $\text{H}^+$  に解離する。 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NH}_3$  は細胞内に移動し、 $\text{NH}_3$  は  $\text{H}^+$  と反応して  $\text{NH}_4^+$  を形成する。この結果、細胞内はアルカリ化する。 $\text{NH}_4\text{Cl}$  を洗い流すと、最初に細胞内に流入した  $\text{NH}_4^+$  と細胞内で形成された  $\text{NH}_4^+$  は解離し、 $\text{NH}_3$  と  $\text{H}^+$  になる。 $\text{NH}_4^+$  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  $\text{H}^+$  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、 $\text{NH}_3$  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 77.0 mM NaCl, 2.0 mM KCl, 2.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.0 mM ピルビン酸ナトリウム, 0.3 mM アスコルビン酸, 0.5 mM グルタチオン, 15.0 mM ブドウ糖, 10.0 mM HEPES であった。また、リンガー液の  $\text{Na}^+$  を除去する場合には、正常リンガーの NaCl を塩化リチウム ( $\text{LiCl}$ ) に置換し、 $\text{Na}^+$ -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 (NaOH) あるいは 1N-水酸化カリウム (KOH) を用いて pH 7.6 に調整し、用いた。アミロライド (1 mM) は浸透圧を考慮せずに、リンガー液に添加し Y-tube で投与した。

単離したミユラー細胞の細胞内 pH 測定には、pH 感受性蛍光色素である 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and 6) Carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM) を用いた。BCECF-AM (5  $\mu\text{M}$ ) 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。一部の実験を除き、細胞内 pH 測定はミユラー細胞の細胞体部の中心で行った。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 [Ratio (495 nm/440 nm)] を求め、細胞内 pH の指標とした。Ratio (495 nm/440 nm) の増大はアルカリ化、減少は酸性化であった。いくつかの細胞では、実験終了後、Ratio (495 nm/440 nm) を Nigericin 法により細胞内 pH に換算した。データ処理には、OriginPro Ver 7.0 (OriginLab Co.) を用いた。

薬品類の多くは、Sigma Chemical Co. から購入した。Papain は Worthington Biochemical Co. から、BCECF-AM, Nigericin は Molecular Probes, Inc. から購入した。

## 実験結果

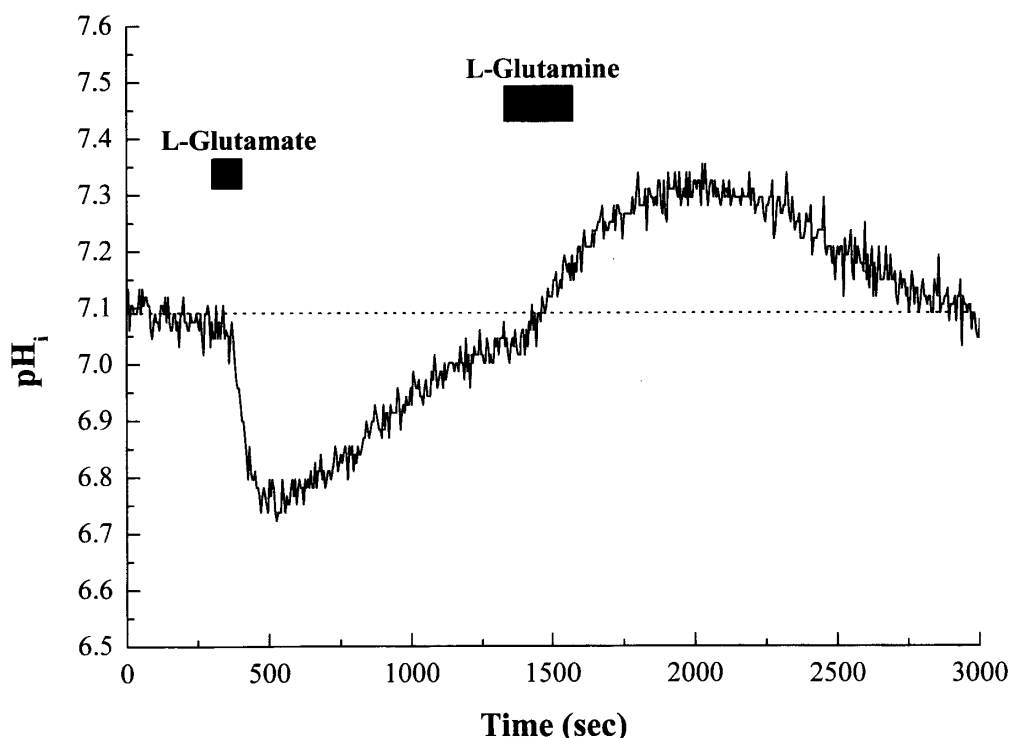
### ミユラー細胞の細胞内 pH

本実験では、リンガー液の H<sup>+</sup> 濃度調整に二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) と HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> による緩衝系でなく、HEPES (10 mM) を用いた。この実験条件下で、ミユラー細胞の細胞内 pH を測定した結果、7.07±0.09 (平均±標準偏差, 細胞数 [n]=7) であった。この pH 値は、Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 共輸送体が機能している条件下で測定された値とほぼ一致していた (Newman, 1996; 7.08±0.04, n=27)。

以上の結果は、Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 共輸送体がミユラー細胞の静止時の細胞内 pH 調節に寄与していない可能性を示している。

### アミノ酸によるミユラー細胞内 pH の変動

ミユラー細胞の細胞膜には、数種類のトランスポーターが発現している。この中で、グル



第2図 グルタミン酸とグルタミンによるミユラー細胞内 pH の増減

グルタミン酸 (図中には L-Glutamate と表記) (100 μM) を正常リンガー液に添加し投与すると、ミユラー細胞の細胞内 pH は低下 (約3.5 pH ユニット) した。次に、グルタミン (図中には L-Glutamine と表記) (10 mM) を投与すると、細胞内 pH は上昇 (約2.5 pH ユニット) した。これらの pH 変化は、グルタミン酸トランスポーターによるグルタミンの取り込みと、またグルタミントランスポーターによるグルタミンの取り込みを反映していると推測される。

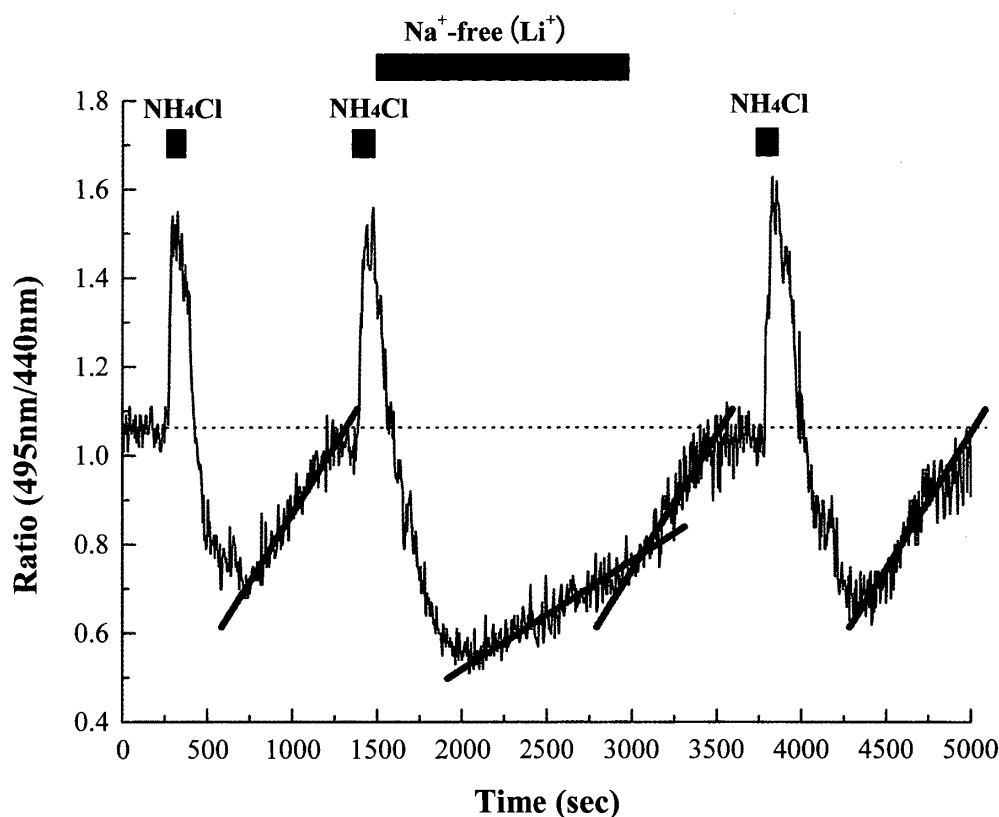
タミン酸トランスポーターおよびグルタミントランスポーターは、細胞内 pH 変化を惹起することが知られている (Brew & Attwell, 1987; Schwartz & Tachibana, 1990; Chaudhry *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2002)。本実験では、グルタミン酸ならびにグルタミンをミュラー細胞に灌流投与し、細胞内 pH への影響を調べた (第 2 図)。これまでの報告 (Brew & Attwell, 1987; Schwartz & Tachibana, 1990; Chaudhry *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2002) 通り、グルタミン酸 (100  $\mu$ M) はミュラー細胞を酸性化し、グルタミン (10 mM) は同じ細胞をアルカリ化した。

以上の結果は、ミュラー細胞にグルタミン酸トランスポーターとグルタミントランスポーターが発現していることを示唆している。

### ミュラー細胞の細胞内 pH 調節メカニズム

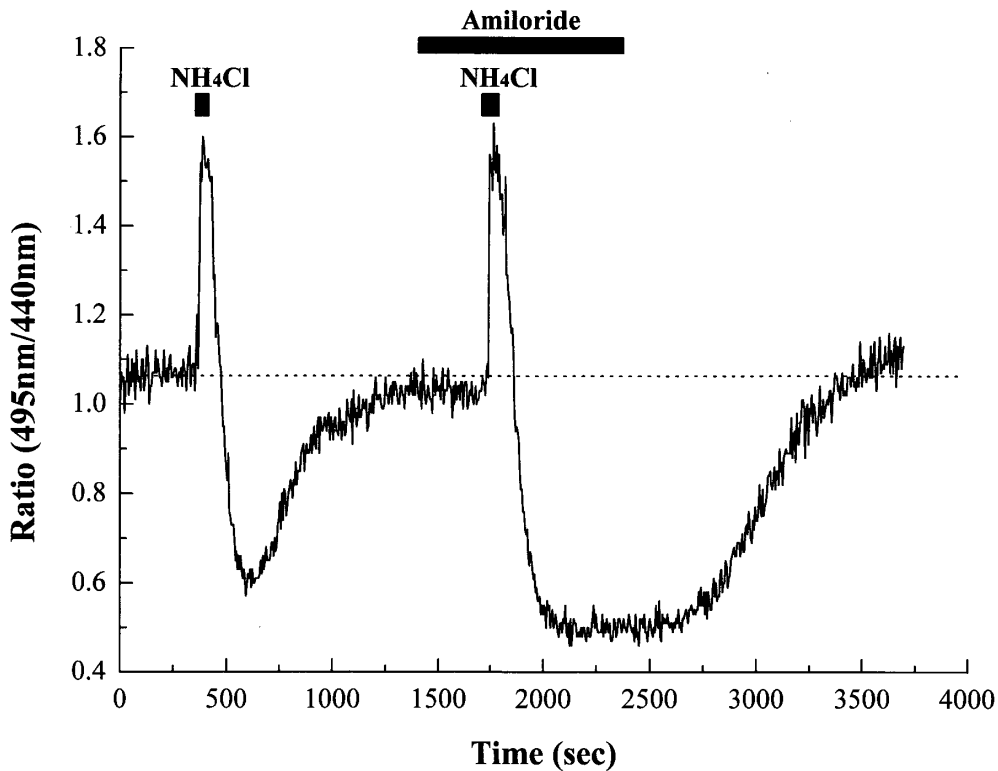
$\text{Na}^+/\text{H}^+$  エクスチェンジャーがミュラー細胞の細胞内 pH 調節に寄与しているか否かを検討するため、正常リンガー液から  $\text{Na}^+$  を除去する実験とアミロライド ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  エクスチェンジャー阻害剤) を添加する実験を行った (第 3 図と第 4 図)。正常リンガー液をアンモニウムリンガー液に交換し灌流すると、Ratio (495 nm/440 nm) は上昇 (アルカリ化) した。正常リンガー液に戻すと、Ratio (495 nm/440 nm) は速やかに低下 (酸性化) し、ゆっくりと回復に向かった。完全に回復した後、再度アンモニウムリンガー液の灌流を行った。アンモニウムリンガー液から  $\text{Na}^+$ -欠如リンガー液に交換し灌流すると、Ratio (495 nm/440 nm) は正常リンガー液に戻した場合よりもさらに低いレベルにまで速やかに低下 (酸性化) した。その回復過程は  $\text{Na}^+$  存在時 (正常リンガー液灌流時) に比べ、相当緩徐であった。 $\text{Na}^+$ -欠如リンガー液を正常リンガー液に交換すると、回復過程は加速した (第 3 図)。別のミュラー細胞を用い、アミロライドが細胞内 pH 調節に及ぼす影響について調べた (第 4 図)。正常リンガー液をアンモニウムリンガー液に交換し灌流すると、Ratio (495 nm/440 nm) は上昇 (アルカリ化) した。正常リンガー液に戻すと、Ratio (495 nm/440 nm) は速やかに低下 (酸性化) し、その後ゆっくりと回復に向かった。次に、アミロライドが存在する条件下で、同様の実験を実施した。アンモニウムリンガー液を灌流すると、ミュラー細胞はアルカリ化した。アンモニウムリンガー液をアミロライド (1 mM) を含む正常リンガー液に戻すと、ミュラー細胞は直ぐに酸性化した。しかし、元の pH レベルへの回復は見られなかった。アミロライドを除去すると、細胞内 pH は速やかに元のレベルへと回復した。

以上の結果は、ミュラー細胞に  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  エクスチェンジャーが発現し、細胞内 pH 調節に寄与していることを示している。



第3図 ミュラー細胞の細胞内 pH に対する細胞外 Na<sup>+</sup>除去の影響

正常リンガー液をアンモニウムリンガー液（図中には NH<sub>4</sub>Cl と表記）に交換し灌流すると、Ratio (495 nm/440 nm) は上昇（アルカリ化）した。正常リンガー液に戻すと、Ratio (495 nm/440 nm) は速やかに低下（酸性化）し、その後ゆっくりと回復に向かった。完全に回復した後、第2回目のアンモニウムリンガー液の灌流を行った。アンモニウムリンガー液から Na<sup>+</sup>-欠如リンガー液（図中には Na<sup>+</sup>-free (Li<sup>+</sup>) と表記）に交換し灌流すると、Ratio (495 nm/440 nm) は正常リンガー液に戻した場合よりもさらに低いレベルにまで速やかに低下（酸性化）した。その回復過程は Na<sup>+</sup>存在時（正常リンガー液灌流時）に比べ、相当緩徐であった。Na<sup>+</sup>-欠如リンガー液を正常リンガー液に交換すると、回復過程は加速した。回復後、第3回目のアンモニウムリンガー液の灌流実験を実施し、第1回目の実験と同様の結果を得た。アンモニウムリンガー液除去に伴う酸性化からの回復過程の時間経過を比較するため、回復過程を直線近似した。赤色線 ( $y=0.000679x + 0.199$ ) は正常リンガー液中での酸性化からの回復過程（第1回目のアンモニウムリンガー液の灌流実験に伴う酸性化からの回復）を、緑色線 ( $y=0.000218x + 0.099$ ) は Na<sup>+</sup>-欠如リンガー液中での酸性化からの回復過程（第2回目のアンモニウムリンガー液の灌流実験に伴う酸性化からの回復）を近似している。緑色線の傾斜が赤色線の約1/3しかなく、これは Na<sup>+</sup>-欠如リンガー液中で酸性化からの回復が著しく阻害されていることを示している。一方、Na<sup>+</sup>-欠如リンガー液を正常リンガー液に戻した後の酸性化からの回復過程は  $y=0.000675x - 1.290$ （赤色線）で、また第3回目を実施したアンモニウムリンガー液の灌流実験で生じた酸性化からの回復過程は  $y=0.000669x - 2.269$ （赤色線）で近似でき、3つの赤色線の傾斜に大きな差異は認められなかった。以上の結果は、ミュラー細胞に Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> エクスチェンジャーが発現していることを示唆している。



第4図 ミュラー細胞の細胞内 pH に対するアミロライドの影響

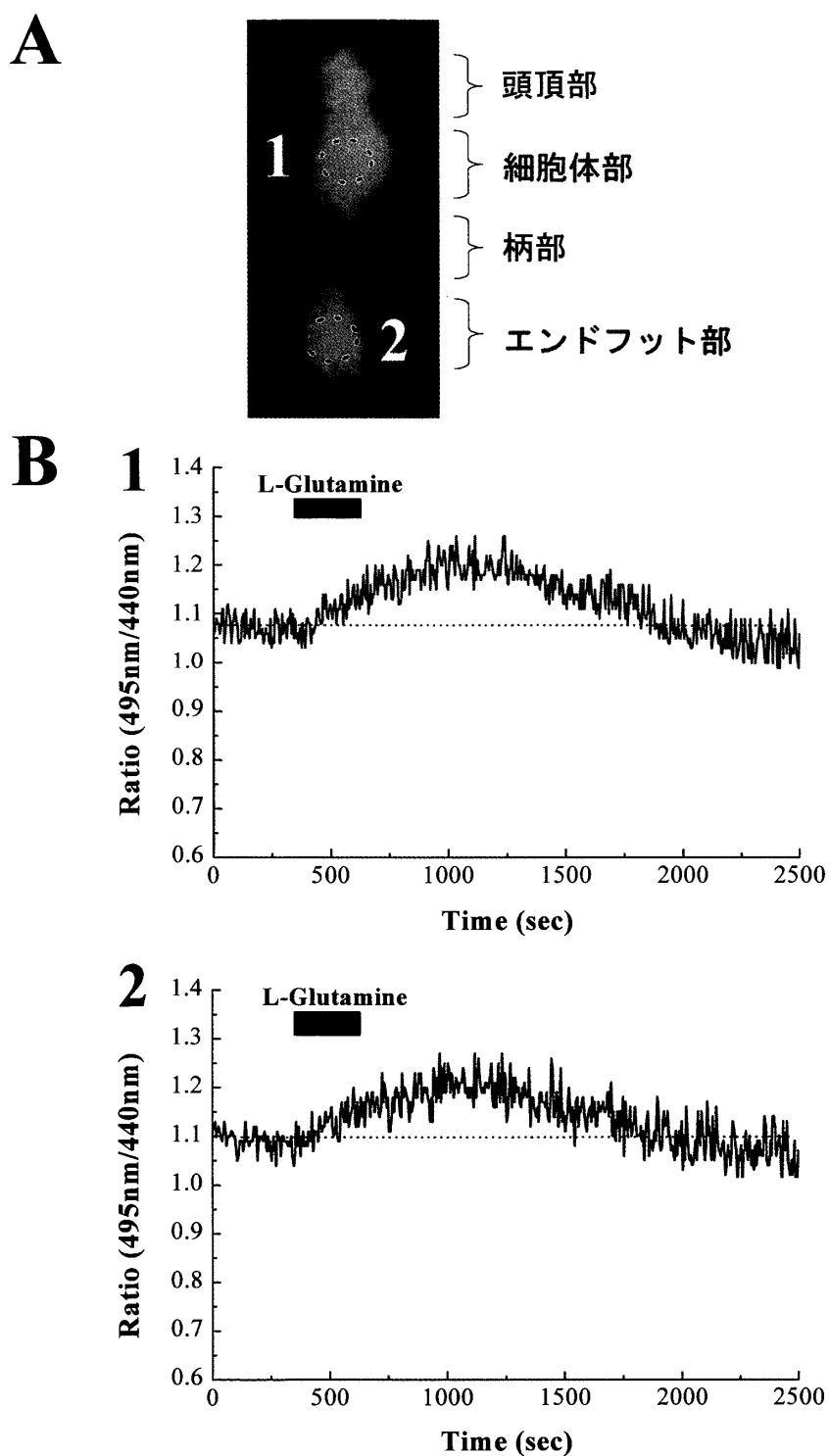
正常リンガー液をアンモニウムリンガー液（図中には  $\text{NH}_4\text{Cl}$  と表記）に交換し灌流すると、Ratio (495 nm/440 nm) は上昇（アルカリ化）した。正常リンガー液に戻すと、Ratio (495 nm/440 nm) は速やかに低下（酸性化）し、その後ゆっくりと回復に向かった。次に、アミロライド（図中には Amiloride と表記）が存在する条件下で、同様の実験を実施した。アンモニウムリンガー液を灌流すると、ミュラー細胞はアルカリ化した。アンモニウムリンガー液をアミロライド（1 mM）を含む正常リンガー液に戻すと、ミュラー細胞は速やかに低下（酸性化）した。しかし、元のレベルへの回復は見られなかった。アミロライドを除去すると、ミュラー細胞の細胞内 pH は元のレベルへと回復した。以上の結果は、ミュラー細胞に  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  エクスチェンジャーが発現し、細胞内 pH 調節に寄与していることを示している。

#### ミュラー細胞内 $\text{H}^+$ 分布の均一性

ミュラー細胞は、網膜を縦方向に貫く大きな細胞である（第1図参照）。ミュラー細胞内の  $\text{H}^+$  分布に部位差があるのか否かを調べるため、同じ細胞の2ヶ所（細胞体部とエンドフット部の両方）から細胞内 pH を測定し、その変化を比較した（第5図）。ミュラー細胞の細胞体部とエンドフット部の両部位で細胞内 pH を同時記録し、グルタミンを投与したところ、両部位での細胞内 pH 変化は概ね一致していた。

以上の結果は、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  エクスチェンジャーがミュラー細胞膜にほぼ均等に分布していることを示唆している。





第 5 図 ミューラー細胞の細胞内 H<sup>+</sup> 分布の均一性

ミューラー細胞の細胞体部とエンドフット部の両部位で、細胞内 pH を同時記録し、その変化を比較した。グルタミン (L-Glutamine; 10 mM) を正常リンガー液に添加して投与すると細胞内 pH は上昇し、洗い流すと元の pH レベルへと回復した。pH 上昇の割合ならびに時間経過に部位差は観察されなかった。以上の結果は、H<sup>+</sup> が細胞内で均一に分布していることを示唆している。

## 考 察

ミュラー細胞の細胞内 pH 調節への  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  エクスチェンジャーの寄与

神経活動やシナプス活動が細胞内外の pH に影響すること、また逆に細胞内外の pH 変化が神経機能（リガンドレセプターやイオンチャネルの活性）に影響することはよく知られている（例えば, Moody, 1984; Chesler & Kaila, 1992; Kaila, 1994; Dixon *et al.*, 1993, 1996; Takahashi *et al.*, 1993; Takahashi & Copenhagen, 1995; 高橋, 2002, 2003）。神経細胞のみならず、ミュラー細胞（グリア細胞）でも細胞内 pH が細胞外の影響（グルタミン酸やグルタミンの作用）を受けるのか否かを調べる目的で、アミノ酸の投与実験を行った（第 2 図）。細胞外に投与したグルタミン酸がミュラー細胞を酸性化すること、またグルタミンがミュラー細胞をアルカリ化することが判明し、神経細胞と同様にグリア細胞でも細胞内 pH が細胞外の物質環境変化の影響を受けることが確実となった（Brew & Attwell, 1987; Schwartz & Tachibana, 1990; Chaudhry *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2002）。今後、ミュラー細胞の pH 変化が網膜内の環境維持・調節にどのような生理的意味を持っているのかを明らかにする必要がある。

Newman (1987, 1991, 1994, 1995, 1996, 1999) は、ミュラー細胞に  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送体が発現し、この共輸送体が光照射に伴って生じる網膜内（細胞外）のアルカリ化を防止する役割を担っていることを報告した。さらに、Newman (1991, 1996) はミュラー細胞に  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  エクスチェンジャーも発現していることを示唆しているが、その機能については検討していない。本研究で実施した  $\text{Na}^+$  欠如実験（第 3 図）ならびにアミロライド投与実験（第 4 図）を勘案すると、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  エクスチェンジャーはミュラー細胞の静止時の細胞内 pH の調節に中心的役割を果たしていると推測される。

網膜に限らず、生物を構成する細胞の中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、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ポンプが継続的に機能し、細胞内に  $\text{K}^+$  を汲み入れそして細胞外に  $\text{Na}^+$  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 Adenosine triphosphate (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  $\text{H}^+$  が増加するため細胞内は酸性化する。少なくとも、ミュラー細胞に発現する  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  エクスチェンジャーが、生体反応の結果生じる酸性化を防止するために機能していることは間違いない。

## 網膜におけるグルタミン酸—グルタミンサイクルの可能性とミュラー細胞の役割

グルタミン酸は、脊椎動物網膜の代表的な興奮性神経伝達物質である。視細胞と一部の双

極細胞は、このグルタミン酸を伝達物質として放出している (Trifonov, 1968; Murakami *et al.*, 1972; Miller & Schwartz, 1983; Murakami & Takahashi, 1987; Ayoub *et al.*, 1989; Copenhagen and Jahr, 1989; Miyachi & Murakami, 1989; Tachibana & Okada, 1991; Takahashi & Murakami, 1991)。神経細胞から放出され、機能を終えたグルタミン酸は、主にミュラー細胞によって細胞内に回収されシナプス間隙から除去される (Brew & Attwell, 1987; Sarantis *et al.*, 1988; Tachibana & Kaneko, 1988; Schwartz & Tachibana, 1990; Eliasof & Werblin, 1993; Grant & Dowling, 1995, 1996; Eliasof *et al.*, 1998a, b)。ミュラー細胞に取り込まれたグルタミン酸は、細胞内に存在するグルタミン合成酵素によりグルタミンに変換されると考えられている (Riepe & Norenberg, 1977, 1978; Linser & Moscona, 1979)。その後、このグルタミンがどのように処理されるのかについては未だ明らかになっていない。これまでに得られた断片的な知見を繋ぎ合わせると、哺乳動物の脳と同様に、網膜でもグルタミン酸-グルタミンサイクルが機能している可能性がある。ミュラー細胞は細胞内に取り込まれたグルタミン酸をグルタミンに変換し、このグルタミンを神経細胞に供給する役割を担っているのかもしれない。

#### 引用文献

- 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.
- Brecha, N. C. and Weigmann, C. (1996), Expression of GAT-1, a high-affinity gamma-aminobutyric acid plasma membrane transporter in the rat retina, *J. Comp. Neurol.*, **345**: 602-611.
- Brew, H. and Attwell, D. (1987), Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells, *Nature*, **327**: 6722-6731.
- Bringmann, A., Schopf, S. and Reichenbach, A. (2000), Developmental regulation of calcium channel-mediated currents in retinal glial (Müller) cells, *J. Neurophysiol.*, **84**: 2975-2983.
- Burckhardt, G., Di Sole, F. and Helmle-Kolb, C. (2002), The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family, *J. Nephrol.*, **15(Suppl.5)**: S3-S21.
- Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Krizaj, D., Barber, D., Strom-Methisen, J., Copenhagen, D. R., and Edwards, R. H. (1999), Molecular analysis of System N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission, *Neuron*, **99**: 769-780.
- Chesler, M. and Kaila, K. (1992), Modulation of pH by neuronal activity, *Trends Neurosci.*, **15**: 396-402.
- Copenhagen, D. R. and Jahr, C. E. (1989), Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors, *Nature*, **341**: 536-539.
- 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.
- Eliasof, S. & 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 func-

- tion of five glutamate transporters cloned from the salamander retina, *Vision Res.*, **38**: 1443–1454.
- Grant, G. B. and Dowling, J. E. (1995), A glutamate-activated chloride current in cone-driven ON bipolar cells of the white perch retina, *J. Neurosci.*, **15**: 3852–3862.
- Grant, G. B. and Dowling, J. E. (1996), ON bipolar cell responses in the teleost retina are generated by two distinct mechanisms, *J. Neurophysiol.*, **76**: 3842–3849.
- Haugh-Scheidt, L. and Ripps, H. (1998), pH regulation of horizontal cells of the skate retina, *Exp. Eye Res.*, **66**: 449–464.
- 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.
- Kaila, K. (1994), Ionic basis of GABA<sub>A</sub> receptor channel function in the nervous system, *Prog. Neurobiol.*, **42**: 489–537.
- Katz, B. J. and Oakley, B. (1990), Evidence for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in vertebrate rod photoreceptors, *Exp. Eye Res.*, **51**: 199–207.
- Kilberg, M. S., Handlogten, M. E., and Christensen, H. N. (1980), Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs, *J. Biol. Chem.*, **255**: 4011–4019.
- Linser, P. and Moscona, A. A. (1979), Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: Localization in Müller fibers and dependence on cell interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**: 6476–6480.
- 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.
- Miyachi, E.-I. and Murakami, M. (1989), Decoupling of horizontal cells in carp and turtle retinæ by intracellular injection of cyclic-AMP, *J. Physiol. (Lond.)*, **419**: 213–224.
- Moody, W. Jr. (1984), Effects of intracellular H<sup>+</sup> on the electrical properties of excitable cells, *Ann. Rev. Neurosci.*, **7**: 257–278.
- 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. 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.
- Newman, E. (1987), Distribution of potassium conductance in mammalian Müller (glial) cells: a comparative study, *J. Neurosci.*, **7**: 2423–2432.
- Newman, E. (1991), Sodium-bicarbonate cotransport in retinal Müller (glial) cells of the salamander, *J. Neurosci.*, **11**: 3972–3983.
- Newman, E. (1994), A physiological measure of carbonic anhydrase in muller cells, *Glia*, **11**: 291–299.
- Newman, E. (1995), Glial cell regulation and Extracellular potassium, In *Neuroglia* (eds. Kettenmann, H. and Ransom, B. R.), pp717–731, Oxford Press.
- Newman, E. (1996), Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium-bicarbonate cotransport, *J. Neurosci.*, **16**: 159–168.
- Newman, E. (1999), Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Müller cells of the rat, *Glia*, **26**: 302–308.
- Newman, E. and Reichenbach, A. (1996), The Müller cell: a functional element of the retina, *TINS*, **19**: 307–312.
- Pannicke, T., Faude, F., Reichenbach, A. and Reichelt, W. (2000), A function of delayed rectifier potassium channels in glial cells: maintenance of an auxiliary membrane potential under pathological conditions, *Brain Res.*, **862**: 187–193.
- Riepe, R. E. and Norenberg, M. D. (1977), Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina, *Nature*, **268**: 654–655.
- Riepe, R. E. and Norenberg, M. D. (1978), Glutamine synthetase in the developing rat retina: An immunohistochemical study, *Expt. Eye Res.*, **27**: 435–444.
- Saarikoski, J., Ruusuvoori, E., Koskelainen, A. and Donner, K. (1997), Regulation of intracellular pH in sala-

- mander retinal rods, *J. Physiol. (Lond.)*, **498.1**: 61–72.
- Sarantis, M., Everett, K. and Attwell, D. (1988), A presynaptic action of glutamate at the cone output synapse, *Nature*, **332**: 451–453.
- Schwartz, E. (1993), L-Glutamate conditionally modulates the K<sup>+</sup> current of Müller glial cells, *Neuron*, **10**: 1141–1149.
- Schwartz, E. and Tachibana, M. (1990), Electrophysiology of glutamate and sodium co-transport in a glial cell of the salamander retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **426**: 43–80.
- Tachibana, M. (1981), Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina, *J. Physiol. (Lond.)*, **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.
- Tachibana, M. and Okada, T. (1991), Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina, *J. Neurosci.*, **11**: 2199–2208.
- 高橋恭一 (2002), トランス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.
- 高橋恭一 (2003), 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, *人間環境学研究*, **1**(1): 1–17.
- Takahashi, K.-I. and Copenhagen, D. R. (1995), Intracellular alkalization enhances inward rectifier K<sup>+</sup> current in retinal horizontal cells of catfish, *Zool. Sci.*, **12**: 29–34.
- 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., Krizaj, D. and D. R. Copenhagen (2002), A current mediated by glutamine transporter SNI in retinal glial cells, *Jan. J. Physiol.*, **52** (Suppl.): S142
- 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.