

Light Adaptation and Sensitivity Regulation by Calcium Feedback in Primate Rods

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8336

霊長類杆体視細胞における明順応とカルシウム フィードバックによる感度調節

金沢大学医学部眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

田 村 敏 博

(平成4年3月12日受付)

両生類動物の杆体視細胞 (杆体) において明順応現象は主に Ca^{2+} のグアニル酸シクラーゼに対する抑制作用 (Ca フィードバック) を介して発現することが明らかになった。しかしサル杆体は殆ど明順応を示さないという報告により、霊長類杆体と冷血動物杆体の間で外節内の光情報交換機構が根本的に異なる可能性が生じた。この真偽を質す目的で、4種のサルの杆体における明順応現象の有無を検討した。サルの微細網膜片より外方に突出した杆体の外節部を微小電極内に吸引・保持し、光照射に対する膜電流の変化 (光応答) を記録した。矩形波光の照射により、光応答の振幅が一過性の頂点を形成した後に低振幅の平坦部へ漸減する現象が観察され、矩形波光応答の平坦部の振幅と光強度の関係は明順応の欠如を示す指数関数曲線より偏位し、緩徐な振幅強度曲線を呈した。背景光照射下の増分フラッシュ光感度と背景光強度の関係はウェーバー・フェヒナーの関係に近似した。これらの結果よりサル杆体が明順応することが判明したので、明順応に関わると推定される Na-Ca 交換機構および Ca フィードバックによる感度調節についてさらに検討した。暗時にサル杆体内に Ca^{2+} を充填した後に強刺激光を照射することによって交換電流が選択的に観察された。実測された交換電流の飽和値は約 5pA であり、光照射中に複数の指数関数成分の和の時間経過をたどって減衰した。また細胞内 Ca^{2+} 濃度を固定して Ca フィードバックを抑えると、弱フラッシュ光に対する光応答の振幅は 2~3 倍に増大し、その頂点潜時は約 2 倍に延長した。実験結果より得られた杆体内のサイクリック GMP (cGMP) の暗時の代謝率 (約 1.2sec^{-1}) と微弱フラッシュ光によって増大する cGMP 分解率の時間経過を、Ca フィードバックによるのみ明順応現象が発現するとしたシミュレーションモデルに適応すると、モデルから導出されたシミュレーション結果は種々の実測結果に近似した。これよりサル杆体においても Ca フィードバックが明順応の主要な機構であると推論された。

Key words primate rods, light adaptation, calcium feedback, Na-Ca exchanger, cGMP hydrolysis

脊椎動物の視細胞には暗時に外節細胞膜を内向きに流れる膜電流 (暗電流) が存在し、視細胞を約 -40mV の脱分極状態に保つ。その結果、視細胞の軸索終末部より定期的に神経伝達物質が放出される。光が照射されると内向き膜電流は減少し、過分極性の膜電位の変化が発生し、軸索終末よりの神経伝達物質の放出が抑制される。視細胞におけるこのような光の受容 [ロドプシン分子 (rhodopsin, Rh) の光異性化] から暗電流の減少に到る光情報交換機構 (phototransduction mechanism) は最近十数年間の研究の成果により次第に明らかになった^{1)~3)}。すなわち光異性化したロドプシン分子 (photoisomerized rhodopsin, Rh*) によりトランスデューシン (G蛋白質) についてホスホジエステラーゼのカスケードが順次活性化され、外節内のサイクリック GMP (cGMP) 濃度が減少する¹⁰⁾。この cGMP 濃度の減少により外節細胞膜に存在する cGMP 感受性チャネルが閉鎖するので暗電流が減少する³⁾。

暗電流の約 15% が Ca^{2+} によって運ばれることが両生類 (ヒキガエル) の杆体視細胞 (以下では杆体と略記する) で明らかになった⁴⁾。こうして暗電流の一部として外節内に流入した Ca^{2+} は外節内の Ca^{2+} 濃度を一定に保つように作用する外節細胞膜上の Na-Ca 交換機構 (Na-Ca exchanger) によって細胞外へ排出される^{4)~9)}。この Na-Ca 交換機構は光に関係なく働くので、光照射によって cGMP 感受性チャネルが閉じると外節内への Ca^{2+} 流入は減少するが、 Ca^{2+} の排出は持続する。その結果、外節内 Ca^{2+} 濃度は減少する^{10)~14)}。光照射による外節内 Ca^{2+} 濃度の減少は cGMP の合成酵素であるグアニル酸シクラーゼに対する Ca^{2+} の抑制効果 (Ca フィードバック) を解除することになり、グアニル酸シクラーゼ活性が増大する^{15)~19)}。すなわち光照射による外節内 Ca^{2+} 濃度の減少は光に対する感度を低下させ、明順応効果をもたらす。

哺乳類の杆体における光情報交換機構は実験の困難さからあ

Abbreviations: BAPTA, 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; EGTA, ethyleneglycol-bis(tetraacetic acid); GTP, guanosine triphosphate; IBMX, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine; PDE, phosphodiesterase; Rh, rhodopsin; Rh*, photoisomerized rhodopsin; TMA, tetramethylammonium

まり解明されていなかったが、哺乳類においても両生類と同様の機構の存在が推測されてきた。しかし霊長類の杆体は両生類のそれと異なり殆ど明順応を示さないという報告²⁰⁾により、霊長類と両生類の間で、ひいては哺乳類と冷血動物の間で外節の光情報交換機構が根本的に異なる可能性が生じた。そこで筆者らは複数種の哺乳類動物(ネコ、ウサギ、ウシ、ラット)の杆体を用いて明順応現象の有無を詳細に検討し、その結果として哺乳類の杆体外節においても両生類と同様の明順応現象が観察されることを明らかにした^{21,22)}。本研究ではよりヒトに近い霊長類の杆体を用いて明順応現象の有無のみならず、両生類と同様のNa-Ca交換機構の有無とCaフィードバックの光感度への影響を検討する。

材料および方法

I. サル杆体標本の作成

カニクイザル (*Macaca fascicularis*)、アカゲザル (*Macaca mulatta*)、サバンナモンキー (*Cercopithecus aethiops*) および夜行性のガーネットガラゴ (*Galago garnetti*) の4種のサルを実験に使用した。動物を1時間暗順応した後にケタミン (10~15mg/kg) の筋注で鎮静化し、ついでペントバルビタール (10~15mg/kg) の静注により全身麻酔した。微赤色光下で一眼あるいは両眼を摘出した。眼球摘出後の以下の実験手技は赤外光照射下に赤外光観察器 (FJW Industries, Elgin, IL, USA) および赤外光感知 TV カメラ (Newvichip model JE-7262, Javelin Electronics, Torrance, CA, USA) による観察下で施行された。まず眼球を HEPES 緩衝ロック液 (以下ではロック液と略記) (その溶液の組成については「方法」のV参照) 中において赤道部で半切し、眼球後半部の周辺部網膜を細かく切り分け実験用網膜片とした。これらの網膜片を4℃の暗黒下で95% O₂・5% CO₂ 混合ガスで通気された Dulbecco's Modified Eagle Media (Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) あるいは100% O₂ ガスで通気された Leibovitz's L-15 Media (Gibco Laboratories Life Technologies Inc.) 内で保存し、眼球摘出後約36時間にわたって実験に供した。杆体の膜電流記録に先立って網膜片を上記の冷暗状態より取り出し、ロック液に100units/mlのコラゲナーゼ (CLSPA grade, Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, USA) と0.3mg/mlのヒアルロニダーゼ (type IV, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を溶解した酵素液に室温暗黒下に20~25分間浸漬して細胞外基質をできるだけ取り除いた。ついでこの酵素液をロック液で2回洗浄した。つぎに sylgard 184 silicone elastomer (Dow Corning Corp., Midland, MI, USA) で内底面を被覆したベトリディッシュ (Falcon, Oxnard, CA, USA) 上に網膜片を視細胞側が上になるように伸展固定し、カミソリ刃で細かく裁断した。この微細網膜片をロック液でみたした膜電流の記録に用いる実験用チェンバー内に移した。また単離した杆体を要する実験には上記のコラゲナーゼとヒアルロニダーゼの酵素液の代わりに、ロック液に10~20units/mlのパパイン (Worthington Biochemical Corp.) とパパインを活性化させる目的で0.25mg/mlのL-システイン (Sigma Chemical Co.) を添加した酵素液を用い、この酵素液に網膜片を室温暗黒下に15分間浸漬した。その他の実験手技は上記と同様であった。

II. 光刺激および膜電流記録装置

光刺激装置は Baylor らの装置²³⁾と同様であった。すべての実験で干渉フィルター (Melles Griot, Irvine, CA, USA; 半値幅10nm) を通して得られた500nmの非偏光単色光を刺激光として用い、膜電流を記録する杆体の長軸に対して垂直に照射した。持続時間が8msecの矩形波刺激光を以下ではフラッシュ光と呼称する。微細網膜片より突出した杆体の外節部あるいは単離した杆体の内節部をロック液でみたした微小電極の先端内部に吸引し、その膜電流を電流-電圧変換器^{23)~26)}へ導出した。微小電極の先端近傍の内径の最小部位に杆体の内節と外節をつなぐ結合線毛部が位置するように吸引力を調節した。電極内での杆体の形状と位置を倒立顕微鏡 (Invert-microscope D, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) に取りつけた赤外光感知 TV カメラ系で観察した。

単離した杆体の内節を微小電極内に吸引する際には核部から軸索終末部を欠如した杆体を用いた。内節と外節のみから成る杆体を微小電極の先端内部に吸引し保持することによって、電極内において杆体の位置を安定に保持し、電極内と電極外間に生じる電気抵抗を高値に保つことができた。微小電極のガラスと細胞膜が直接接触することを防ぎ、微小電極内への吸引中に生じる杆体の損傷を抑える目的で、微小電極の内面と外面とともに tri-n-butylchlorosilane (Pfaltz & Bauer Inc., Waterbury, CT, USA) で被覆した。微小電極の先端部の内径の最小部が、吸引する杆体の内節あるいは外節の断面の直径に合致するように微小電極を作成した。微小電極内をロック液でみたして電極をロック液中に置いた状態での電極の電気抵抗 (A) は4~6MΩであり、さらに電極内に杆体を吸引した状態での電極の電気抵抗 (B) は10~20MΩであった。本報中の膜電流値は特に断らない限り有効電流記録率 (effective current collecting factor) [(B-A)/B]²³⁾ を考慮せず記録した電流値そのものであり、図6, 7, 9および10で示す膜電流の変化は灌流液を変換することにより生じる灌流液相間電流 (junction current)²⁸⁾ をあらかじめ減じた値で表示された。膜電流を直流増幅 (DC-20~100Hz) し、陰極線オシロスコープ (Tektronix AX502, Tektronix Inc., Beaverton, OR, USA) 管面で観察した。

III. 杆体外節の大きさ

カニクイザル、アカゲザルおよびサバンナモンキーの杆体外節は直径約1.8μm、長さ約25μmの円筒形であり、ガーネットガラゴのそれは直径約1.2μm、長さ約25μmの円筒形であった。外節の長軸に対して垂直に非偏光刺激光を照射する本報の光刺激条件で、杆体外節部の光学的密度 (optical density) を0.016μm⁻¹²⁹⁾、ロドプシン分子に対する量子効率 (quantum efficiency) を0.67²⁸⁾に仮定すると、杆体外節の有効光照射面積 (effective collecting area)²⁸⁾ はカニクイザル、アカゲザルおよびサバンナモンキーでは約0.8μm²、ガーネットガラゴでは約0.35μm²と計算された。

IV. 灌流方法

本報では緩徐な灌流方法 (灌流法1) と速い灌流方法 (灌流法2) の2つの灌流方法を用いた。灌流法1は Hodgkin ら²⁸⁾と同様の灌流方法であり、複数種類の灌流液が重力によってまず2つの6方向回転選択型活栓に流入し、ついで4方向流動型活栓へと流入した。チェンバーへ流入する灌流液は4方向流動型活栓を切り換えることによって変換された。この方法での微小電極の先端近傍での灌流液の変換は灌流液相間電流の測定結果から約300msecで完了すると推測された。また微小電極先端部

より外方に出た杆体の一部が灌流液の流れにより屈曲し損傷されるのを防ぐ目的で外節の長軸が灌流液の流れに対し平行になるように微小電極の先端付近を約90°曲げた。灌流法2は杆体内節部を微小電極先端部に吸引・保持し、その外節周囲の灌流液を可及的にすみやかに切り換える目的の灌流方法である。まず複数種類の灌流液が重力によって2つの6方向回転選択型活栓に流入し、この活栓により2種類の灌流液が選択され、ついでθ型2連ガラス管を介して実験用チェンバー内に流入した。このθ型2連ガラス管は実験用チェンバーに固定されており、微小電極の先端部がθ型2連ガラス管のいずれかの開口部に相対するように窒素ガスの圧力で交互に切り換えられた。この灌流方法における微小電極の先端近傍での灌流液の変換は灌流液相間電流の測定結果から100msec以内で完了すると推測された。またこの灌流方法では微小電極の先端付近を約90°曲げて電極先端部より外方へ出た杆体外節の損傷を防ぐだけでなく、灌流液の速い流れにより杆体が微小電極外へ抜去されるのを防ぐ目的で微小電極内に持続的に陰圧をかけた。その際、結合線毛部の位置を電極内に正しく保持する目的で、あらかじめ電極内にガラス繊維で作成したストッパーを挿入しておいた(図1)。

V. 溶液の組成と温度調節

灌流法1では重炭酸塩緩衝ロック液²⁰⁾ [120mM NaCl, 3.6 mM KCl, 1.2mM CaCl₂, 2.4mM MgCl₂, 20mM NaHCO₃, 0.02mM Na-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 3mM Na-HEPES, 10mM Dextrose] を用いた。95% O₂・5% CO₂混合ガスが通気された重炭酸塩緩衝ロック液のpHは7.6であった。一部の実験ではこれに3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) を添加した液を用いた。灌流液を恒温水槽 (Precision, Chicago, IL, USA) 内で38°Cに維持し95% O₂・5% CO₂混合ガ

スで連続して通気した。その後灌流液は重力により恒温水槽内より実験用チェンバー内に流入した。この途中経路で灌流液の温度は低下するので、灌流液が実験用チェンバー内に流入する直前のガラス管に巻きつけた銀線を直流通電によって加熱することにより、微小電極の先端近傍に取りつけた温度計(後述)で測定される温度を約38°Cに保った。

灌流法2ではHEPES緩衝ロック液²⁰⁾ (140mM NaCl, 3.6 mM KCl, 1.2mM CaCl₂, 2.4mM MgCl₂, 0.02mM Na-EDTA, 3mM Na-HEPES, 10mM Dextrose; pH 7.6) を用いた。またHEPES緩衝ロック液の0.02mM Na-EDTAと3mM Na-HEPESをそれぞれ0.02mM TMA (tetramethylammonium)-EDTAと3mM TMA-HEPESに置換し、さらに140mM NaClを140mM LiClに置換した溶液をリチウムロック液と呼称し、140mM NaClを140mM Guanidinium Chlorideに置換した溶液をグアニジニウムロック液と呼称した。また杆体外節へのCa²⁺流入と杆体外節からのCa²⁺流出を停止させた実験ではリチウムロック液あるいはグアニジニウムロック液からCaCl₂を除き0.2mM TMA-EGTA (ethyleneglycol-bis-tris-acetic acid) を添加した溶液を用い、これを無Na-無Ca液と呼称した。この灌流法では灌流液は恒温水槽内で約55°Cに維持され100% O₂ガスで連続して通気された後、重力により恒温水槽内より実験用チェンバー内に流入すると、途中で加熱することなく微小電極の先端近傍の温度を38°Cに保つことができた。

微小電極の先端近傍の灌流液の温度は電極の先端部より約0.5mmの後方に取り付けたサーミスター温度計 (YSI Temperature probe #511, YSI Instrument Co., Yellow Springs, OH, USA) で測定された。

VI. シミュレーションモデル

杆体外節内のCaフィードバックと光応答を記述するシミュ

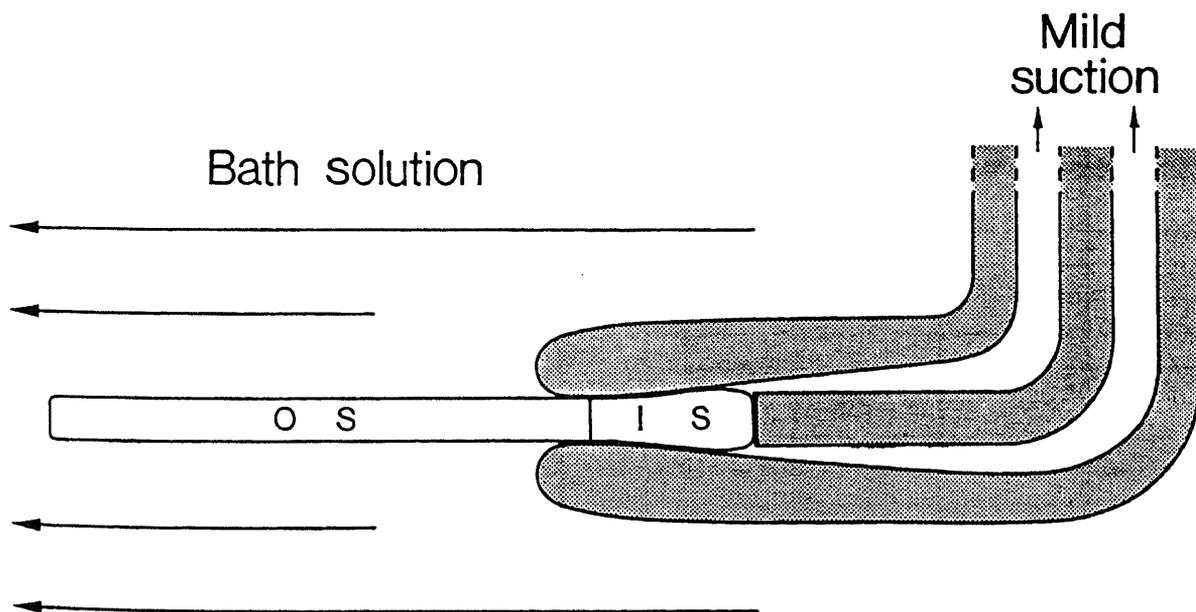
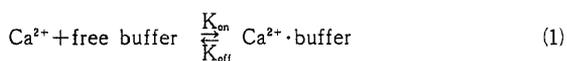


Fig. 1. Recording configuration for an isolated primate rod. The inner segment (IS) of an isolated rod with cell body missing was drawn by gentle suction into a pipette in order to achieve good mechanical stability and high seal resistance during recording. To avoid bending and damage of the outer segment (OS) during perfusion, the tip of the suction pipette was bent at right angle so that the long axis of outer segment was oriented parallel to the solution stream. A fine glass fiber was appropriately positioned inside the pipette to serve as a stop against the inner segment.

レーションモデルにおいて用いた式について以下で説明する。この項では具体的な数値ではなく抽象的な記号によって式中の変数を表記する。杆体外節内の Ca^{2+} の動きと Ca フィードバックの概略を図 2 に示す。細胞内 Ca^{2+} 濃度は cGMP 感受性チャネルより流入する Ca^{2+} 量と Na-Ca 交換機構により排出される Ca^{2+} 量によって規定される。細胞内 Ca^{2+} 濃度は細胞内の Ca 緩衝系に結合した結合 Ca^{2+} の濃度 (Cab) と結合していない遊離 Ca^{2+} の濃度 (Caf) に大別される。また外節内の cGMP も結合 cGMP と結合していない遊離 cGMP に区別されるが、本報のモデルでは未だに性状が明らかでない結合 cGMP を考慮せず、細胞内の遊離 cGMP の濃度を G と表記した (「考察」の III 参照)。これまで視細胞外節内における Ca フィードバックの光情報変換機構に対する影響を考慮したモデルが両生類の杆体^{30,31} および両生類の錐体³² とサルの錐体³³ で報告された。本報のモデルは多くの点で Forti ら³¹ のモデルに類似する。ただし本報のモデルにおける主目的は、モデルより導出される応答波形が実波形に近似するように変数の値を加減することではなく、実測値をモデルの変数に適用して導出される応答波形と実波形を比較して、本報のモデルの妥当性を検討することにある (「成績」の VI および VII 参照)。

細胞内の Ca 緩衝系 (細胞内の全 Ca 緩衝系の濃度を以下 Rt とする) と Ca^{2+} の相互作用は下記の如く記述される。



$$\frac{d\text{Cab}}{dt} = K_{\text{on}} \cdot \text{Caf} \cdot (\text{Rt} - \text{Cab}) - K_{\text{off}} \cdot \text{Cab} \quad (2)$$

(2)式において K_{on} と K_{off} はそれぞれ Ca^{2+} の Ca 緩衝系への結合および解離の速度定数である。もし Ca 緩衝系が極めて速い緩衝系であり、Caf と Cab が常に平衡状態 (すなわち $d\text{Cab}/dt=0$) にあるなら、(2)式は(3)式に変換できる。

$$\text{Cab} = \frac{\text{Caf} \cdot \text{Rt}}{\text{Caf} + K_d} \quad (3)$$

(3)式において K_d は $K_{\text{on}}/K_{\text{off}}$ で表される解離定数であり、細胞内の全 Ca^{2+} 濃度 (Cat) は(4)式で示される。

$$\text{Cat} = \text{Caf} + \text{Cab} = \text{Caf} \cdot \left(1 + \frac{\text{Rt}}{\text{Caf} + K_d}\right) \quad (4)$$

Cat の単位時間あたりの変化率は cGMP 感受性チャネルを介する Ca^{2+} 流入率と Na-Ca 交換機構を介する Ca^{2+} 排出率により決定され、(5)式で表される。

$$\frac{d\text{Cat}}{dt} = \frac{1}{F \cdot V} \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot \text{Pca} \cdot \text{jch} - \text{jex}\right) \quad (5)$$

(5)式において F はファラデー定数、V は杆体外節の細胞質内容積、jch は cGMP 感受性チャネルを通る膜電流、Pca は cGMP 感受性チャネルを通る Ca^{2+} 電流の jch に占める比率、jex は交換電流である。また jch は G によって(6)式で表される^{33,34}。

$$\text{jch} = \text{Jmax} \cdot \frac{G^n}{G^n + K_{\text{ch}}^n} \quad (6)$$

(6)式において Jmax は Na-Ca 交換機構を抑制し全 cGMP 感受性チャネルを開放した状態で観察される最大膜電流であり、Kch は jch が Jmax/2 になる cGMP 濃度であり、n は Hill 係数である。n の値として約 2~4³ が報告されており、本報のモデルでは後述の如く n を 2.5 とした。生理的状态では $G \ll K_{\text{ch}}$ ³⁰ であるので、(6)式は(7)式に変換できる。

$$\text{jch} \approx \text{Jmax} \cdot \frac{G^n}{K_{\text{ch}}^n} \quad (7)$$

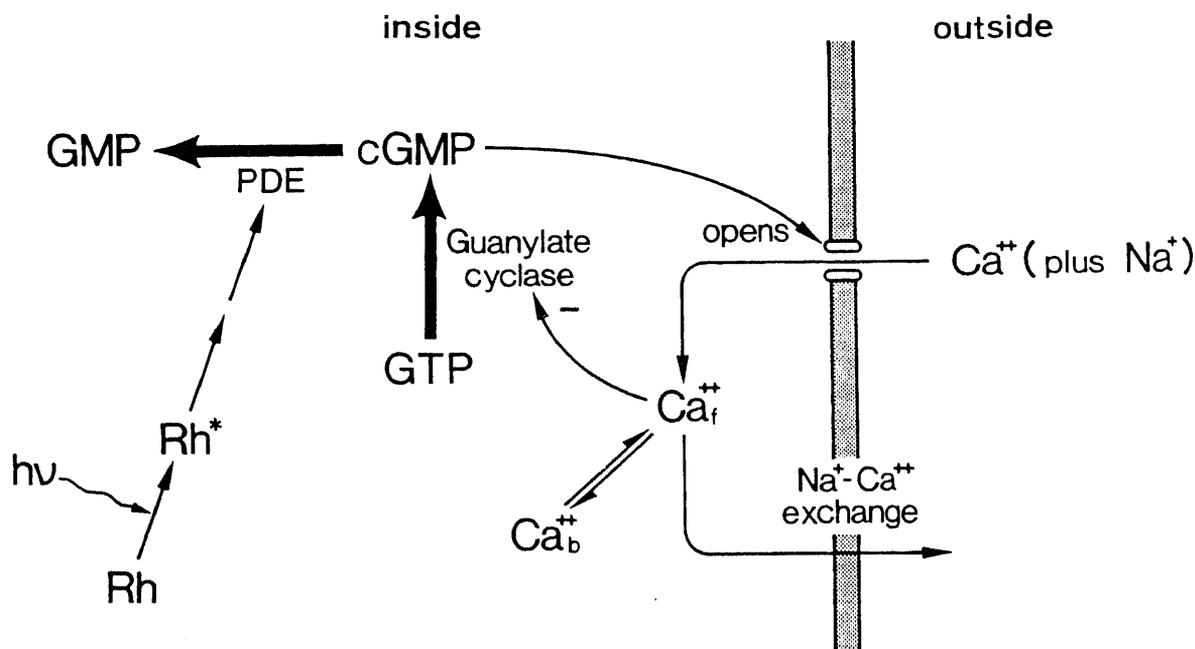


Fig. 2. Scheme of the Ca^{2+} feedback mechanism in rod phototransduction. $h\nu$, photon; Rh, rhodopsin; Rh^* , photoisomerized rhodopsin; PDE, phosphodiesterase; Ca_f^{2+} , free Ca^{2+} ; Ca_b^{2+} , bound Ca^{2+} ; -, inhibition.

交換電流 (j_{ex}) は Caf を基質濃度とするミカエリスメンテンの式で規定される^{9,35)}と報告されているので、(8)式の如く表記される。

$$j_{ex} = J_{exc} \cdot \frac{Caf}{Caf + K_{ex}} \quad (8)$$

(8)式において J_{exc} は Na-Ca 交換機構が最大活性を示す状態における交換電流の飽和値であり、 K_{ex} は j_{ex} が $J_{exc}/2$ になる Caf である。強矩形波刺激光の照射によって全 cGMP 感受性チャネルを閉鎖し続けると、(2)式 [あるいは(4)式] と(5)式と(8)式から Caf は最終的に零に達すると予測される。しかし実際には Ca^{2+} を排出する Na-Ca 交換機構はある電気化学的平衡状態に達すると停止する(「成績」の VII を参照)。「成績」の VI および VII では Na-Ca 交換機構の活性が停止する平衡状態を考慮して、(8)式を修飾した式を用いたシミュレーションも行った。

G の単位時間あたりの変化率は cGMP の合成率 (α) と加水分解速度定数 (β) により(9)式の如く記述される¹⁷⁾。

$$\frac{dG}{dt} = \alpha - \beta \cdot G \quad (9)$$

α はグアニル酸シクラーゼの基質である guanosine triphosphate (GTP) の細胞内濃度により変化するが、Hodgkin ら¹⁷⁾と同様に生理的状態では視細胞外節内には十分量の GTP が存在し、グアニル酸シクラーゼ活性は Ca^{2+} による抑制作用をうける^{18,19)}ので α は Caf によってのみ規定されると仮定すると、 α は(10)式で表記される。

$$\alpha = \frac{A_{max}}{1 + (Caf/K_{cy})^m} \quad (10)$$

(10)式において A_{max} は cGMP の最大合成率であり、 K_{cy} はグアニル酸シクラーゼの活性を最大活性の1/2にする Caf であり、 m は Hill 係数である。また暗時の cGMP 合成率と Caf をそれぞれ α_0 と Caf₀ とすると A_{max} は(11)式で表される。

$$A_{max} = \alpha_0 \cdot \left[1 + \left(\frac{Caf_0}{K_{cy}} \right)^m \right] \quad (11)$$

(11)式により(10)式は(12)式に変換される。

$$\alpha = \alpha_0 \cdot \frac{1 + (Caf_0/K_{cy})^m}{1 + (Caf/K_{cy})^m} \quad (12)$$

(10)式からは Caf が高値になると α が零に近づくことが予測されるが、Koch ら¹⁸⁾の生化学的実験では高 Caf の状態でもなお有意なグアニル酸シクラーゼ活性が観察された。(10)式を(13)式に置換することにより彼ら¹⁸⁾の実験結果に近似するように α を記述できる。

$$\alpha = \frac{A_{max}}{1 + (Caf/K_{cy})^m} + f \cdot A_{max} \quad (13)$$

(13)式において f は定数である。しかし彼ら¹⁸⁾の実験は非生理的な高 Mg^{2+} 濃度 (11 mM $MgCl_2$) の灌流液下で行われており、また 0.1 μM 以上の Caf ではグアニル酸シクラーゼ活性がほぼ一定の最低値を示すという実験結果は、生理的条件下で Caf を 0.1 μM 以上に増大するとグアニル酸シクラーゼ活性がさらに低下したという電気生理学的実験結果^{26,27)}に反しており、そのま

までは生理的状態には適応できない。また(13)式の f に 0.05 という小さな値を与えても、なお本報のモデルより導かれる光応答波形は Ca フィードバックの効果が弱く、光応答の回復過程に著しい律動性応答が現れて実波形に合致しなかったため、本報のモデルでは α を記述する式として f に零を代入した(13)式、すなわち(10)式 [あるいは(12)式] を採用した。

cGMP の単位時間あたりの加水分解率 (β) はホスホジエステラーゼの暗時における活性と光照射により増大する活性の和として規定される。すなわち暗時の cGMP 分解率を β_0 とし、1光子の捕獲により増大する cGMP 分解率を $\beta^*(t)$ とすると β は(14)式で表記される。

$$\beta = \beta_0 + \beta^*(t) \cdot I_1 \quad (14)$$

(14)式において I_1 は刺激光強度である。本報のモデルでは光照射により増大する cGMP 分解率は I_1 に比例すると仮定した。この仮定は Barkdoll ら²⁸⁾のホスホジエステラーゼ活性の生化学的実験結果に基づいている。彼ら²⁸⁾の報告によれば、光異性化するロドプシン分子数が毎秒 10^4 個以下という本報で用いた刺激光強度下では光照射により増大する cGMP 分解率は刺激光強度に比例すると推測される。(12)式と(14)式を(9)式に代入して(15)式を得る。

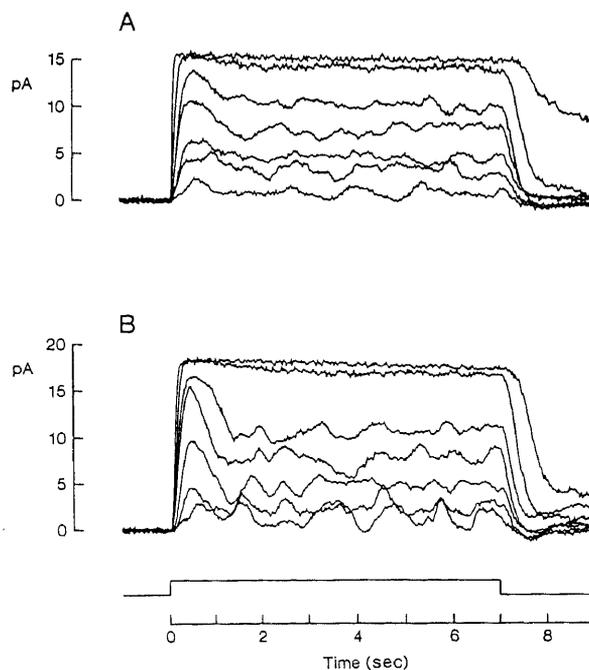


Fig. 3. Families of current responses from two rods of *M. fascicularis* elicited by light steps of different intensities. Current responses in each family were recorded from a rod outer segment projecting from a fragment of retina. A. Cell with the typical relaxation from an initial transient peak. Light intensities were 18, 64, 110, 240, 400, 850 and 3400 $Rh^* \cdot sec^{-1}$, respectively. The corresponding responses were averages of 2, 2, 2, 2, 2, 1 and 1 trials. Temperature was 38.5°C. B. Cell with the striking relaxation. Light intensities were 18, 30, 110, 240, 400, 850 and 1600 $Rh^* \cdot sec^{-1}$, respectively. The corresponding responses were averages of 2, 2, 3, 2, 2, 1 and 1 trials. Temperature was 38.0°C. Bandwidth was DC~25 Hz in both cases.

$$\frac{dG}{dt} = \alpha_0 \cdot \frac{1 + (Caf_0/Kcy)^m}{1 + (Caf/Kcy)^m} - [\beta_0 + \beta^*(t) \cdot I_r] \cdot G \quad (15)$$

暗時の定常状態では $\beta^*(t) \cdot I_r = dG/dt = 0$ が成立するので(15式)が導かれる。

$$\alpha_0 = \beta_0 \cdot G_0 \quad (16)$$

(16式)においては G_0 は暗時の細胞内 cGMP 濃度である。すなわち(16式)は(17式)に変換できる。

$$\frac{dG}{dt} = \beta_0 \cdot G_0 \cdot \frac{1 + (Caf_0/Kcy)^m}{1 + (Caf/Kcy)^m} - [\beta_0 + \beta^*(t) \cdot I_r] \cdot G \quad (17)$$

杆体外節で記録される全膜電流 (j) は、ともに内向き膜電流である jch と jex の和として(18式)の如く表現される。

$$j = jch + jex \quad (18)$$

「成績」では、細胞内 Ca 緩衝系を上記の(2式)~(4式)のみならず、性質を異にする2種類の細胞内 Ca 緩衝系の存在を仮定した式でも記述してシミュレーションを行った(後述)。上記の(2式)~(18式)における変数値は下記の如く規定された。両生類杆体外節部の細胞内灌流実験³⁴⁾ および杆体外節細胞膜の切り出し細胞膜片を用いた実験³⁹⁾ の各電気生理学的実験結果を参考にして、 Kch と n をそれぞれ $50 \mu M$ と 2.5 とした、サル杆体の暗時の生理的状态における jch (jch_0) は約 $20 pA$ であり、この jch_0 が $Jmax$ の約 1% に相当する³⁴⁾⁽⁴⁰⁾ ことが判明しているの

で、 $Jmax$ を $2000 pA$ とした。これらの値を(7式)に代入することによって G_0 の値として $7.9 \mu M$ を得た。また暗時の定常状態では(5式)において $dCat/dt = 0$ が成立し、(5式)において Pca に 0.1 (「成績」のIV参照) および jch_0 に $20 pA$ を代入することにより、暗時の交換電流値 (jex_0) として $1 pA$ を得た。すなわち暗時の j (j_0) は(18式)より $21 pA$ となる。本報では Caf_0 として $0.3 \mu M$ ⁽²¹⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾ を、また Kcy と m 値としてそれぞれ $100 nM$ ⁽⁸⁾ と 4 ⁽⁸⁾ を採用した。

成 績

1. 背景光照射による明順応現象

複数種の哺乳類動物(ネコ、ウサギ、ウシ、ラット)の杆体において両生類と同様の明順応現象が観察されることをすでに明らかにしたが⁽²¹⁾⁽²²⁾、本研究では霊長類であるサルの杆体においても明順応現象が観察されるか否かを検討した。Tamura ら⁽²¹⁾ の実験方法に準じて、微細網膜片より外方に突出した一つの杆体外節部をロック液でみたした微小電極の先端内部に吸引・保持し、灌流法1により重碳酸塩緩衝ロック液で灌流して光応答を記録した。

Baylor ら⁽²⁰⁾ により殆ど明順応現象が観察されないと報告されたサルと同種のカニクイザルの杆体より記録された矩形波光照射に対する光応答(以下では矩形波光応答と略記する)を図3に示す。低強度の矩形波光照射により矩形波光応答上に観察される不規則雑音様の低周波数成分は、膜電流を記録中の杆体外節部に捕獲される光子数のばらつきに因ると推測される。矩形

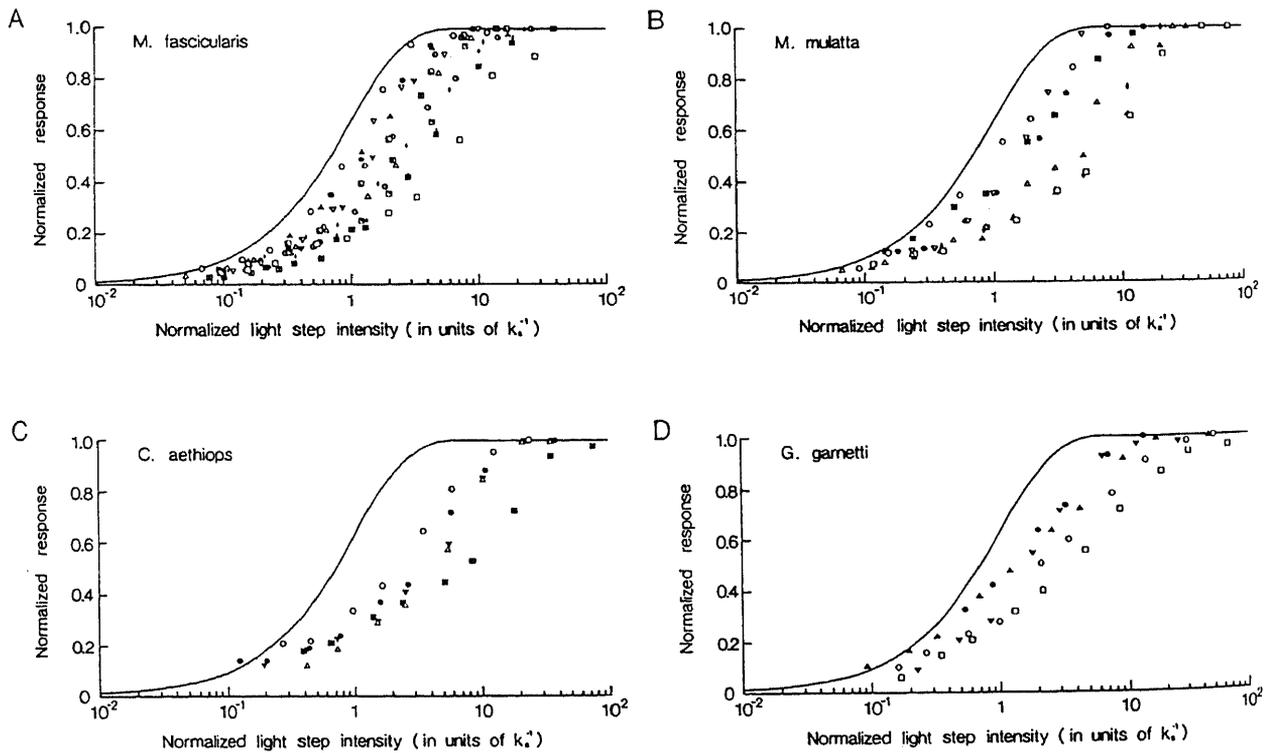


Fig. 4. Collected response-intensity relations derived from the step response families at steady state, plotted on normalized axes, from 15 rods of *M. fascicularis* (A), 8 rods of *M. mulatta* (B), 5 rods of *C. aethiops* (C) and 5 rods of *G. garnetti* (D). Continuous curves in A~D were drawn according to Eq. 19 in the text. Saturated photocurrents were $13.0 \sim 27.0 pA$ (A), $11.0 \sim 25.0 pA$ (B), $10.0 \sim 17.6 pA$ (C) and $7.6 \sim 12.1 pA$ (D). Temperature ranges were $37.0 \sim 41.0^\circ C$ (A), $38.0 \sim 41.0^\circ C$ (B), $36.5 \sim 39.0^\circ C$ (C) and $37.0 \sim 39.5^\circ C$ (D). The data obtained from the experiments in Fig. 3A and 3B are indicated by closed triangles and closed diamonds in Fig. 4A, respectively.

波光応答の振幅が中等度以上の光応答において明順応現象の一つである応答初期の一過性頂点よりやや低振幅の平坦部への漸減現象(以下では漸減現象と略記する)が観察された。実験に用いた15個のカニクイザルの杆体よりの矩形波光応答のうち、平均的な漸減現象を呈すると判断された矩形波光応答を図3Aに、また最も著しい漸減現象が観察された矩形波光応答を図3Bに示す。図3Aに示す漸減現象の大きさおよび時間経過は上記4種の哺乳類動物の杆体におけるそれら²¹⁾²²⁾に近似した。矩形波光応答が漸減現象を終えて応答振幅の安定した平坦部の振幅を光応答飽和時の振幅で除して正規化した値(f_s)と矩形波光強度(I_s)との関係を、15個のカニクイザルの杆体より求め図4Aにまとめた。図3AおよびBに示す杆体の矩形波光応答の f_s 対 I_s の関係はそれぞれ図4Aの▲と◆に対応する。同様の実験をさらに8個のアカゲザルの杆体、5個のサバンナモンキーの杆体および5個のガーネットガラゴの杆体を用いて行い、これらのサル杆体の矩形波光応答の平坦部における f_s 対 I_s の関係をそれぞれ図4B、図4Cおよび図4Dに示す。図4A、B、CおよびDにおける滑らかな曲線は(19)式に従って描かれた。

$$f_s = 1 - \exp(-k_s \cdot I_s) \quad (19)$$

(19)式において k_s は光に対する感度を記述する比例定数(後述参照)であり、 $\exp(x)$ は自然対数の底(e)の x 乗を意味する。(19)式は、杆体外節内の個々の光異性化したロドプシン分子がその近傍のcGMP感受性チャネルを閉鎖することによって生じる光応答(以下では単一フォトン応答と略記する)は互いに独立しており、個々の単一フォトン応答が統計的に加算された結果が杆体よりの光応答として現れると仮定して導かれた²⁰⁾²⁵⁾。すなわち(19)式は明順応が存在しない状態での f_s 対 I_s の関係を記述する。図4の如く、4種のサル杆体の矩形波光応答の平坦部における f_s 対 I_s の関係は(19)式より導かれた滑らかな曲線より明らかに偏位し、より緩やかな f_s 対 I_s の関係を示した。すなわち漸減現象が過ぎた矩形波光応答の平坦部では光強度が増大するにつれ明順応状態がより顕著になると考えられる。こうした滑らかな曲線よりの偏位は他の哺乳類動物の杆体よりの実験結果²¹⁾²²⁾とはほぼ同程度であった。図4において個々の杆体よりの f_s 対 I_s の関係を滑らかな曲線との相互の位置関係は個々の杆体

の $k_s = k_r \cdot t_i$ によって規定される。ここで t_i は各杆体における微弱フラッシュ光応答の積分時間(integration time)²⁶⁾である(表1参照)。また k_r は微弱フラッシュ光応答の感度を記述する定数であり、微弱フラッシュ光応答の頂点振幅を暗電流値で除して振幅値を正規化し、さらに微弱フラッシュ光強度で除した値である(k_r は表1の単一フォトン応答の頂点振幅を暗電流値で除した値に一致する²⁰⁾²³⁾(表1参照)。低強度の矩形波光照射では個々の杆体よりの f_s 対 I_s の関係は滑らかな曲線に近似しており、低強度の矩形波光照射では明順応効果がいまだ有意には発現されていないと考えられる。4種のサル杆体の矩形波光応答を概観すると、矩形波光応答の平坦部の振幅は約100~400 $Rh^* \cdot sec^{-1}$ の光強度で飽和時の振幅の半分になり、約2000~4000 $Rh^* \cdot sec^{-1}$ の光強度で飽和した(表1参照)。これらの値は他の哺乳類動物の杆体よりの値²¹⁾²²⁾に近似する。

ついで背景光照射による増分フラッシュ光に対する感度の影響を調べ明順応現象を検討した。Tamuraら²¹⁾およびNakataniら²²⁾の方法に準じて、ある強度の背景光を照射し矩形波光応答の漸減現象が過ぎ光応答振幅が安定した約5秒以後より、フラッシュ光応答がかるうじて検出される強度の増分フラッシュ光を15~30回照射し、背景光下の増分フラッシュ光感度(S_F)を求めた。背景光照射による感度の低下は S_F を暗所下の微弱フラッシュ光に対する感度(S_F^0)で除した S_F/S_F^0 で表現される。なお S_F および S_F^0 はともにフラッシュ光応答の頂点振幅を暗電流で除し、さらにフラッシュ光強度で除した値であり、 $\mu m^2 \cdot photons^{-1}$ の単位で記述される。4種のサル杆体における背景光強度と S_F/S_F^0 の関係を図5に示す。図5A、B、CおよびDの縦軸と横軸はともに対数で表示されている。横軸の背景光強度は、個々の杆体において S_F/S_F^0 を1/2にする背景光強度 I_0 (すなわちdark lightの光強度に等しい)で背景光強度(I_s)を除して正規化されている。図5A、B、CおよびDにおける滑らかな実線と破線はそれぞれ(20)式と(21)式に基づいて描かれた。

$$S_F/S_F^0 = \frac{1}{1 + I_s/I_0} \quad (20)$$

$$S_F/S_F^0 = \exp(-k_s \cdot I_s) \quad (21)$$

(20)式は順応状態を記述するのに汎用されるウェーバー・フェヒ

Table 1 Collected parameters for light-induced current responses from rods of different primate species

Species	Dark current at steady state in darkness	Single-photon response			Steady state of step response		Incremental flash on background I_0
		Amplitude	Peak latency	t_i	Half-saturating I_s	Saturating I_s	
	pA	pA	msec	msec	$Rh^* \cdot sec^{-1}$	$Rh^* \cdot sec^{-1}$	$Rh^* \cdot sec^{-1}$
M. fascicularis	18.1±3.8 (15)	0.62±0.21 (15)	234±40 (15)	348±91 (15)	280±139 (15)	ca. 3000 (15)	52±34 (10)
M. mulatta	18.1±5.2 (8)	0.97±0.48 (8)	233±47 (8)	313±64 (8)	317±102 (8)	ca. 3000 (8)	37±24 (6)
C. aethiops	13.2±3.1 (5)	0.77±0.31 (5)	211±44 (5)	334±149 (5)	390±162 (5)	ca. 4000 (5)	38±17 (3)
G. garnetti	9.5±1.7 (5)	0.59±0.28 (5)	203±18 (5)	298±32 (5)	118±82 (5)	ca. 2000 (5)	28±10 (4)

Each entry shows the mean and the standard deviation. The number in parentheses indicates the number of cells studied. t_i , integration time; I_0 , step light intensity; I_s , constant in Weber-Fechner relation (Eq. 20 in the text); Rh^* , number of rhodopsin isomerizations. The number of Rh^* was calculated from calibrated light intensities and an effective collecting area of $0.8 \mu m^2$ for rods of first three species and $0.35 \mu m^2$ for rods of G. garnetti. The amplitudes of single-photon responses were estimated from the ratio σ^2/m , where σ^2 and m are respectively the variance and the mean of the peak amplitudes of the responses to a series of identical dim flashes. The saturating I_s of step responses are rough values because of the asymptotic approach of the light response to saturation.

ナーの関係を表す。また(20)式は I_s を変数として(19)式を微分して得られた式であり、(19)式と同様に明順応が存在しない状態での S_F/S_F^0 と背景光強度との関係を記述する²⁰⁻²²⁾。図5において、個々のシンボルで表記した個々のサル杆体における S_F/S_F^0 と背景光強度の関係と破線との相互の位置関係は、図4と同様に個々の杆体の $k_s = k_r \cdot t_i$ によって規定される。実験に用いた4種のサル杆体ともに(20)式に基づいて描かれた破線より(20)式に基づいて描かれた実線により近似する。サル杆体より得られた I_0 の平均値は4種のサルともに約 $30 \sim 50 \text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ (表1参照)と、他の哺乳類動物の杆体の I_0 値^{21,22)}に近似した。また個々のサル杆体における S_F/S_F^0 と背景光強度の関係は、 S_F が S_F^0 の約 $1/25$ ないし約 $1/100$ に低下するまでは実線で示したウェーバー・フェヒナーの関係にはほぼ従い、この範囲は再び他の哺乳類動物の杆体がウェーバー・フェヒナーの関係に従う範囲^{21,22)}に近似した。さらに背景光強度を強めると、背景光に対する光応

答の振幅値は飽和値に近づくので正確に S_F を求めることが困難となった。その結果 S_F/S_F^0 は急激に低下し、両対数軸の図において傾きが -1 以下の減弱を示した。

II. 交換電流

両生類の視細胞外節において細胞外より細胞内への Na^+ 流入に伴う細胞外への Ca^{2+} 排出 (Na-Ca 交換機構) が背景光による光感度の調節と明順応現象の発現に主要な役割を担うことが示された⁴⁵⁻⁴⁷⁾ので、霊長類においても両生類と同様の Na-Ca 交換機構による Ca^{2+} の杆体外節外への排出が存在するか否かを検討した。両生類の杆体では cGMP 感受性チャネルを通過する暗電流の約15%が Ca^{2+} によって運ばれており⁴⁾、暗時の生理的条件下ではこの Ca^{2+} 流入とはほぼ同量の Ca^{2+} が Na-Ca 交換機構によって細胞外へ排出されるので⁴⁸⁻⁵⁰⁾、暗時の生理的条件下において Na-Ca 交換機構の活性によって生じる内向き膜電流 (交換電流) は cGMP 感受性チャネルを通る暗電流の約7.5%にす

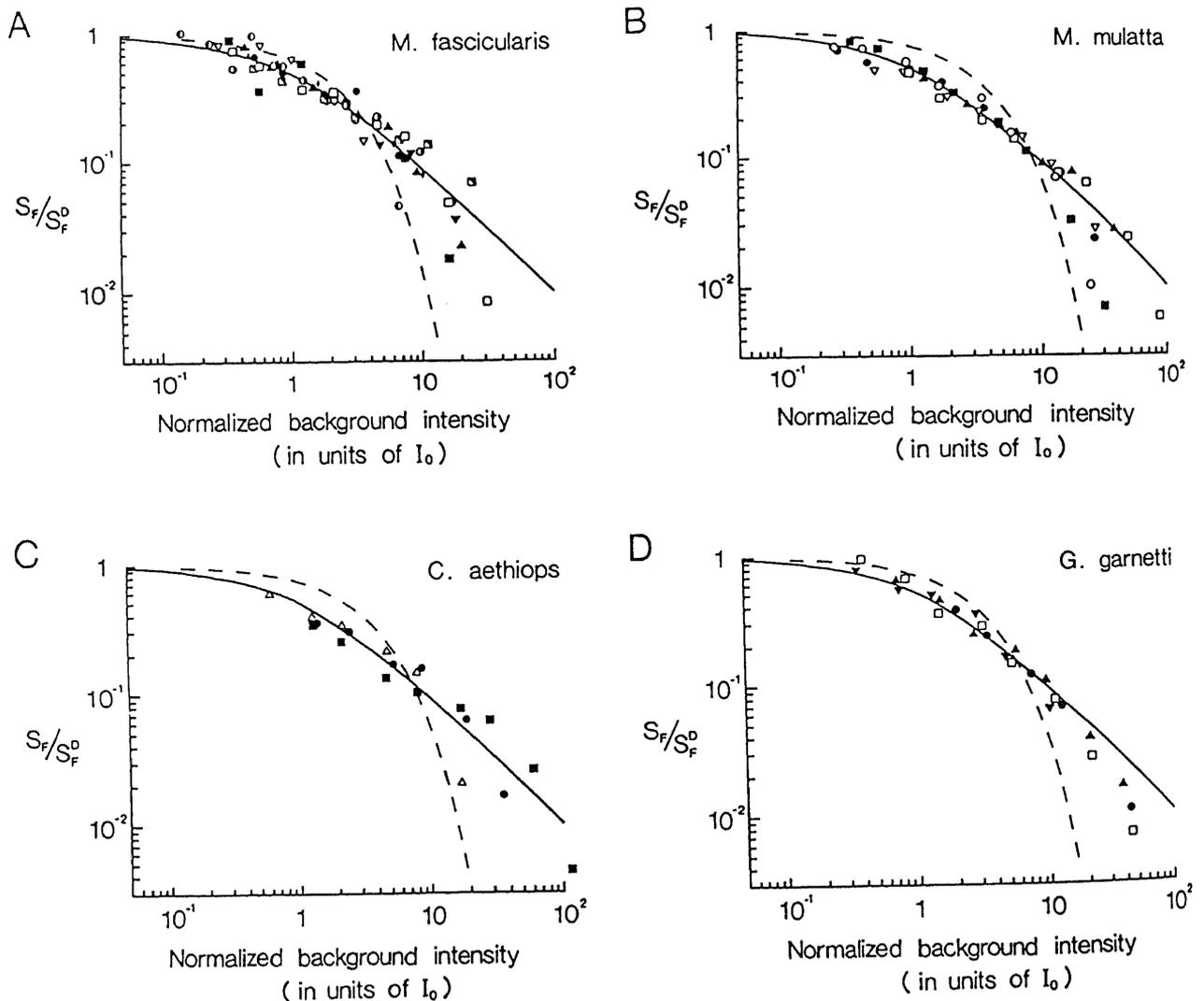


Fig. 5. Collected relations between incremental flash sensitivities and background light intensities, plotted on normalized axes, from 10 rods of *M. fascicularis* (A), 6 rods of *M. mulatta* (B), 3 rods of *C. aethiops* (C) and 4 rods of *G. garnetti* (D). Incremental flash responses were recorded from rod outer segments projecting from retinal fragments. Solid curves in A~D were drawn according to Eq. 20, and dashed curves were from Eq. 21 in the text. The position of dashed curve relative to experimental points represents the average position for all cells. Saturated photocurrents were 11.0~20.5 pA (A), 10.7~25.0 pA (B), 11.4~16.6 pA (C) and 6.0~12.2 pA (D). Temperature ranges were 37.0~41.0°C (A), 38.5~41.0°C (B), 36.5~39.0°C (C) and 37.0~39.5°C (D).

ぎない。したがって霊長類の杆体でも生理的条件では暗時の Na-Ca 交換機構による Ca^{2+} の細胞外への排出による交換電流値は小さいと推測される。Yau¹⁰ また Nakatani⁹ の実験方法に準じて、ホスホジエステラーゼ阻害剤である IBMX を添加したロック液で杆体を灌流して細胞内 cGMP 濃度を上昇させることにより暗時の細胞内への Ca^{2+} 流入を増大させて杆体外節の Na-Ca 交換機構の活性を増大させ、ついで強刺激光の照射により全ての cGMP 感受性チャネルを閉鎖させて、発電性である交換電流のみを分離し観察した。アカゲザルの微細網膜片（「方法」の I 参照）より突出した杆体外節を 0.5mM IBMX を添加したロック液に 30 秒間浸漬した後に杆体外節をすばやく微小電極の先端部に吸引・保持した状態において強矩形波刺激光 ($12000\text{Rh}^{\cdot}\text{sec}^{-1}$) を照射した実験の結果を図 6 に示す。刺激光照射により膜電流は直ちに 0 pA に達せず、約 4 pA の平坦部を形成した後に 0 pA へ漸減した。両生類での同様の実験結果より、この 4 pA から 0 pA へ漸減する一過性の内向き膜電

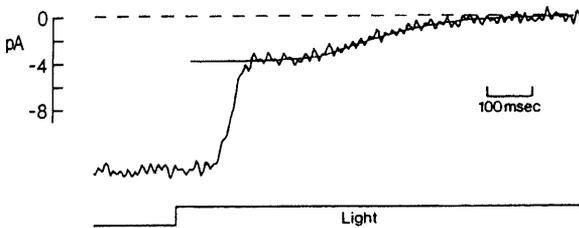


Fig. 6. Na^+ - Ca^{2+} exchange current measured from a single rod of *M. mulatta*. A rod outer segment projecting from a retinal fragment was sucked into a pipette after being exposed to 0.5mM IBMX in Locke solution for 30sec. The exchange current was recorded as the inward current in response to a bright step of light ($12000\text{Rh}^{\cdot}\text{sec}^{-1}$). Rod 3 of Table 2. 37.5°C . Bandwidth was DC~100Hz. The smooth curve was drawn according to Eqs. 22 and 24 in the text with the values of R_{t1} , K_{d1} , R_{t2} and K_{d2} in Table 2A.

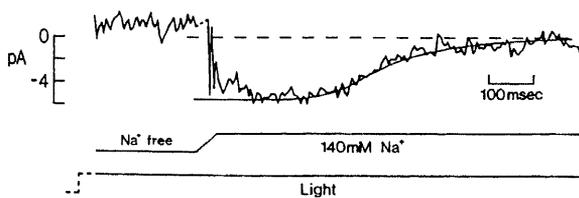


Fig. 7. Na^+ - Ca^{2+} exchange current recorded after a Ca^{2+} load. The inner segment of an isolated rod of *M. fascicularis* was sucked into a pipette and the outer segment was exposed to 0.2mM IBMX in Na^+ free-140 mM guanidinium solution for 3sec to induce a Ca^{2+} load. The exchange current was activated by switching back to Locke solution after the onset of a bright step of light ($3400\text{Rh}^{\cdot}\text{sec}^{-1}$). A few large spikes caused by mechanical vibration during solution change were removed and replaced by a small dashed line. The junction current caused by solution change was not completely subtracted in this experiment, as indicated by the small shift in baseline. A large dashed line indicates baseline in dark current (0pA) after solution change. Rod 5 of Table 2. 37.5°C . Bandwidth was DC~100Hz. The smooth curve was drawn according to Eqs. 22 and 24 in the text with the values of R_{t1} , K_{d1} , R_{t2} and K_{d2} in Table 2A.

流は IBMX により増大し強調された交換電流であると解釈される。図 6 に示す実験をさらに 1 個のカニクイザルと 3 個のアカゲザルの杆体においても行い、図 6 と同様の結果を得た。0.5mM IBMX を添加したロック液で杆体を浸漬した時間は 8 秒~2 分間であり、交換電流の初期に観察される平坦部の電流値すなわち J_{exc} に近似した電流値は 2.9~5.2pA (平均値士標準偏差は $4.0 \pm 0.9\text{pA}$) であった。上記の実測された J_{exc} の近似値のうちの最大値 5.2pA がもっとも機械的損傷の少ない(すなわち正常状態に近い)杆体から得られた J_{exc} であると仮定すれば、この電流値を有効電流記録率で除して得られる真の J_{exc} は約 6.5pA と計算される。また単離した杆体の内節を微小電極の先端部に吸引・保持した状態で灌流液を IBMX を添加したグアニジウム-ロック液(無 Na 液)に切り換えた状態では、IBMX によって Ca^{2+} の細胞内への流入は促進されるが、Na-Ca 交換機構は停止するので Ca^{2+} の細胞外への排出は抑制される。その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度が高まると考えられる。この状態で細胞外灌流液をロック液に変換し、Na-Ca 交換機構を再び作動させると増大した交換電流が観察されることが、両生類の杆体での同様の実験結果から推測される。図 7 は単離したカニクイザルの杆体において灌流法 2 を用いて上記の実験を行った結果を示す。微小電極の先端部に杆体の内節部を吸引・保持し、暗順応下に 0.2mM IBMX を添加したグアニジウム-ロック液で 3 秒間灌流した後に、持続時間 2 秒の強矩形波刺激光 ($3400\text{Rh}^{\cdot}\text{sec}^{-1}$) を照射して全 cGMP 感受性チャネルを閉鎖し、ついで杆体外節の灌流液を再びロック液に置換すると一過性の内向き膜電流が観察された。この一過性の内向き膜

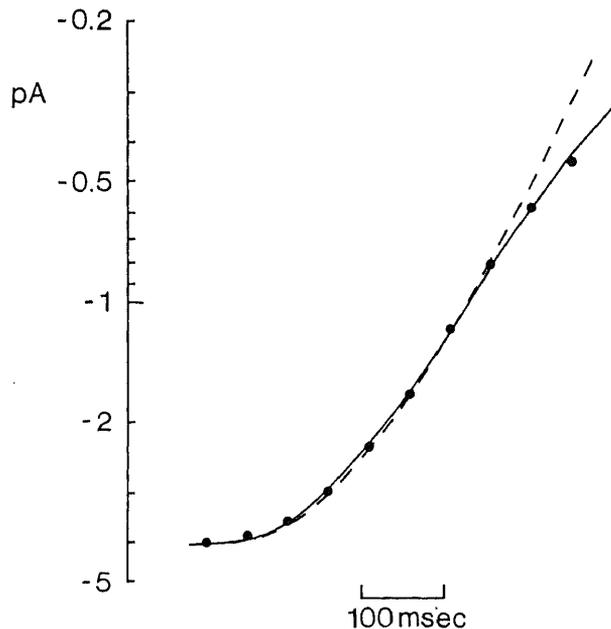


Fig. 8. Decline of the exchange current from Fig. 6 replotted on semi-logarithmic coordinates. The amplitude of exchange current is indicated at 50msec intervals by filled circles. The dashed curve was drawn on the assumption of a single intracellular Ca^{2+} -buffer, according to Eqs. 4 and 22 in the text with the values of $400 \mu\text{M}$ for R_t and $3 \mu\text{M}$ for K_d . The continuous curve was drawn on the assumption of two intracellular Ca^{2+} -buffers, according to Eqs. 22 and 24 in the text with the values in Table 2A.

電流も両生類の杆体での実験結果との相同性から交換電流であると解釈される。この実験方法では交換電流を観察する目的で行った前述の実験方法(図6)に比べ、十分大きな暗電流を有する杆体の検出と実験中の安定した膜電流の保持が困難であった。図6で観察された交換電流の時間経過を図8の●で示す。交換電流の時間経過はCafの時間経過を反映しており、ひいてはCafを調節する杆体外節内のCa緩衝系の濃度(Rt)と結合速度定数(K_{on})および解離速度定数(K_{off})を間接的に反映する。この考えに立脚して、交換電流の実測結果に基づいてRt、 K_{on} および K_{off} について検討した。図6で示す実験で交換電流が選択的に観察される期間中(すなわち強矩形波光の刺激中)のCatは、(5)式と(8)式より導かれる(24)式で表される。

$$\frac{dCat}{dt} = \frac{-1}{F \cdot V} \cdot j_{ex} = \frac{-j_{exc}}{F \cdot V} \cdot \frac{Caf}{Caf + K_{ex}} \quad (22)$$

典型的なサル杆体外節の暗時の生理的状態における交換電流(j_{ex})とCaf(Caf_0)をそれぞれ1pAと0.3 μ Mとし(「方法」のVI参照)、また上記の如く j_{exc} を6.5pAに設定すると、(8)式より K_{ex} は1.65 μ Mと計算される。この K_{ex} 値はサンショウウオ杆体より得られた実測値(2.3 μ M)³⁰に近似する。またサル杆体外節の長さおよび直径の実測値はそれぞれ約25 μ mと約1.8 μ mであったので、杆体外節の体積の約半分である細胞内容積(外節細胞膜内にあり、かつ円板膜外に相当する容積)Vは約30 μ m³と計算される。まず細胞内のCa緩衝系は(3)式で表される一種類の極めて速い緩衝系(以下では単一Ca緩衝系と呼称する)であると仮定した。細胞内のCa緩衝系のRtとKdにそれぞれ任意の値を代入し、Catの初期値として j_{exc} に近似した交換電流を出力するに足る十分大きな値を与えると、(4)式および(22)式より j_{ex} のみならずCatとCafの時間経過が求められる。すなわち j_{ex} の時間経過はRtとKdの値に依存する。このように得られた j_{ex} の理論的な時間経過が実測された時間経過に合致するようにRtとKdの値を決定した。図8の破線はRtとKdの値をそれぞれ400 μ Mと3 μ Mとして理論的に計算された j_{ex} の時間経過を示す。実測された j_{ex} の飽和値(交換電流の初期に観察された平坦部の電流値)と理論的に導かれた j_{ex} の飽和値が合致するように破線を垂直方向に移動させてある。図6および図7で示す実験方法により得た5個のサル杆体の交換電流に対して上記と同様の検討を加え、実測結果に最も合致するRtとKdの値としてそれぞれ360 \pm 40 μ M(平均値 \pm 標準偏差)と3 \pm 0.7 μ Mを得た。(4)式と(22)式より導かれる交換電流は最終的に指数関数的に減衰し、その減衰の時定数(τ)は(23)式で表現される⁴⁾。

$$\tau = \frac{F \cdot V \cdot K_{ex}}{j_{exc}} \cdot \frac{Rt + Kd}{Kd} \quad (23)$$

上記のRtとKdの平均値を(23)式に代入すると、交換電流の減衰の時定数は約90msecと計算された。

細胞内のCa緩衝系を一種類とした上記の仮定は、未定の変数がRtとKdの2つのみと簡潔である。しかし図8の破線で示された理論的 j_{ex} は小電流に減弱すると図中の●で示された j_{ex} の実測値よりずれる。図8では電流値を対数表示しているので理論的と実測値のずれは強調されているが、同様のずれは交換電流のすべての実測値においても観察された。Hodgkinら⁹⁾によって提唱された2種類の細胞内Ca緩衝系の存在を仮

定すれば、理論的に導かれる交換電流の時間経過を実測値のそれに合わせることが出来る。2種類の細胞内Ca緩衝系をそれぞれ緩衝系1と緩衝系2と呼称し、両者がともに極めて速い緩衝系であると仮定しそれぞれの細胞内濃度と解離定数をRt₁とKd₁およびRt₂とKd₂で表記すると、(4)式は(24)式に置き換えられる(以下では急速Ca緩衝系と呼称する)。

$$Cat = Caf \cdot \left(1 + \frac{Rt_1}{Caf + Kd_1} + \frac{Rt_2}{Caf + Kd_2} \right) \quad (24)$$

(24)式にRt₁=400 μ M、Kd₁=3 μ M、Rt₂=85 μ M、Kd₂=0.05 μ Mの各値を代入し、またCatの初期値として上記と同様に十分大きな値を与えて、(22)式と(24)式より求められた j_{ex} の理論的時間経過を図8の実線に示す。図8の実線は破線に比べ、より実測値の時間経過に近似している。図8の実線で示された理論的 j_{ex} を図6の交換電流の実波形に重ねて滑らかな実線で表記した(図6参照)。図7においても同様の解析より得られた理論的 j_{ex} を交換電流の実波形に重ねて滑らかな実線で表記した。

(24)式ではCabとCafが常に平衡状態にある極めて速いCa緩衝系が仮定されたが、結合速度定数と解離速度定数が有限値であるより緩徐な2種類のCa緩衝系の存在を仮定しても、理論的 j_{ex} の時間経過を実測値のそれに合致させることができる。この仮定を記述するには(22)式および(24)式を(25)式~(27)式に置き換える必要がある(以下では緩徐Ca緩衝系と呼称する)。なお2種類のCa緩衝系をそれぞれ緩衝系1と緩衝系2と呼称し、それぞれのCa緩衝系に結合した結合Ca²⁺の濃度をCab₁とCab₂で表記する。

$$\frac{dCaf}{dt} = \frac{-1}{F \cdot V} \cdot j_{ex} - \frac{dCab_1}{dt} - \frac{dCab_2}{dt} \quad (25)$$

$$\frac{dCab_1}{dt} = K_{on1} \cdot Caf \cdot (Rt_1 - Cab_1) - K_{off1} \cdot Cab_1 \quad (26)$$

$$\frac{dCab_2}{dt} = K_{on2} \cdot Caf \cdot (Rt_2 - Cab_2) - K_{off2} \cdot Cab_2 \quad (27)$$

(25)式と(27)式における K_{on1} と K_{off1} および K_{on2} と K_{off2} はそれぞれ緩衝系1と緩衝系2の結合速度定数と解離速度定数である。例えば(25)式~(27)式に、Rt₁=450 μ M、 K_{on1} =20sec⁻¹、Kd₁= K_{off1}/K_{on1} =8 μ M、Rt₂=90 μ M、 K_{off2} =5sec⁻¹、Kd₂= K_{off2}/K_{on2} =0.5 μ Mの各値と十分大きなCafの初期値を代入して得られる理論的 j_{ex} の時間経過は図8の実線に極めて近似する。上記の6個の変数のうちの K_{off1} と K_{off2} の値は、シミュレーションより得られる光応答波形の回復過程に著しい律動性応答が現れないように上記の如く設定した(「成績」のVI参照)。急速Ca緩衝系および緩徐Ca緩衝系を仮定して、図6および図7で示す実験方法により得た5個のサル杆体の交換電流の時間経過に理論的交換電流の時間経過が合致するようにRt₁、Kd₁、Rt₂およびKd₂の各値を求め、その結果を表2A、Bにまとめ、それらの平均値と標準偏差も併記した。図6および図7に示す交換電流はそれぞれ表2の杆体3と杆体5において得られた。緩徐Ca緩衝系では急速Ca緩衝系に比べ変数が K_{on1} と K_{off2} の2個多いが、後述の如くシミュレーションより得られる光応答波形をより実波形に近似させることができた(図11および図12参照)。また表2Cは細胞内の状態がある電気化学的平衡状態に達するとNa-Ca交換機構が停止するというより精密な仮定(「方法」のVI

および「成績」のVII参照)に基づいて(8)式を(4)式に置換し、上記と同様の実験結果の解析を通して得られた数値を示す。

III. 微弱フラッシュ光の光応答に対する Ca フィードバックの影響

前項でサル杆体外節においても Na-Ca 交換機構が存在することが判明したので、両生類と同様に Ca フィードバックがサル杆体外節において光に対する感度を調節する能力を有するかを検討した。図9にこの目的でアカゲザル杆体を用いて行った実験結果の一例を示す。単離した杆体の内節部のみを微小電極内に保持し、外節周囲を灌流法2を用いて灌流した。Ca フィー

ドバックの効果を除く目的で、細胞外灌流液をロック液より無 Na-無 Ca 液に置換した。すなわち細胞外灌流液より Ca²⁺ を除くことにより細胞内への Ca²⁺ 流入を抑え、また細胞外灌流液より Na⁺ を除くことにより Na-Ca 交換機構を停止させて Ca²⁺ 流出を抑え Caf を暗時の定常値に固定した。図9Aの左側の2波形はロック液で灌流した状態で微弱フラッシュ光 (F1; 9.8Rh*) と強フラッシュ光 (F2; 280Rh*) を照射した際の光応答のそれぞれ8回と2回の加算平均波形であり、図9Aの右側の2波形は無 Na-無 Ca 液で灌流した状態で上記と同一の微弱フラッシュ光 (F1; 9.8Rh*) と強フラッシュ光 (F3; 370Rh*) を照射した際の光応答のそれぞれ2回の加算平均波形である。F2 と F3 の強フラッシュ光刺激(図9A)は暗電流の 0pA を確認する目的で照射された。無 Na-無 Ca 液を灌流した約5秒間で暗電流の値は殆ど変化しなかった。暗電流値は Caf 値に極めて鋭敏に反応して変動する²⁰⁾ことが判明しているため、無 Na-無 Ca 液灌流中の Caf は安定に保たれていたと推測される。図9Bにロック液灌流下と無 Na-無 Ca 液灌流下における微弱フラッシュ光 (F1) に対する光応答をそれぞれの状態での暗電流値で除して正規化させて表示する。Caf を固定して Ca フィードバックを無効にした状態での光応答の振幅はロック液灌流下の対照波形のそれに比較して約2.5倍大きく、またその頂点潜時は約2倍に遅延していた。すなわちサル杆体においても

Table 2. Curve-fitting parameters for the decline of the exchange current

A. The parameters of two fast Ca²⁺ buffers system :
C₀ = 0, K_{ex} = 1.65 μM

Rod	Rt ₁	Kd ₁	Rt ₂	Kd ₂
	μM	μM	μM	μM
1	370	4.2	95	0.06
2	350	2.6	100	0.07
3	400	3.0	85	0.05
4	350	3.2	75	0.07
5	300	4.0	80	0.05
Mean	354	3.40	87	0.060
S.D.	36	0.68	10	0.010

B. The parameters of two slow Ca²⁺ buffers system :
C₀ = 0, K_{ex} = 1.65 μM, K_{off1} = 20sec⁻¹, K_{off2} = 5sec⁻¹

Rod	Rt ₁	Kd ₁	Rt ₂	Kd ₂
	μM	μM	μM	μM
1	650	30	100	0.50
2	400	9	110	0.50
3	450	8	90	0.50
4	450	12	85	0.55
5	600	50	90	0.50
Mean	510	21.8	95	0.51
S.D.	108	18.1	10	0.022

C. The parameters of modified two slow Ca²⁺ buffers system :
C₀ = 0, K_{ex} = 1.1 μM, K_{off1} = 20sec⁻¹, K_{off2} = 5sec⁻¹

Rod	Rt ₁	Kd ₁	Rt ₂	Kd ₂
	μM	μM	μM	μM
1	650	23.0	140	0.30
2	400	6.1	150	0.40
3	450	6.0	140	0.25
4	450	8.0	115	0.40
5	600	35.0	110	0.30
Mean	510	15.62	131	0.33
S.D.	108	13.0	17	0.067

The parameters in table refer to Eqs. 24-27 in the text ; C₀ refers to Eq. 41 in the text. In A and B, Eq. 41 with C₀ = 0 reduces to Eq. 8 in the text. In C, the value of 1.1 μM for K_{ex} is obtained from Eq. 41 with the values of 6.5pA for J_{exc} and 1pA for j_{ex} in darkness.

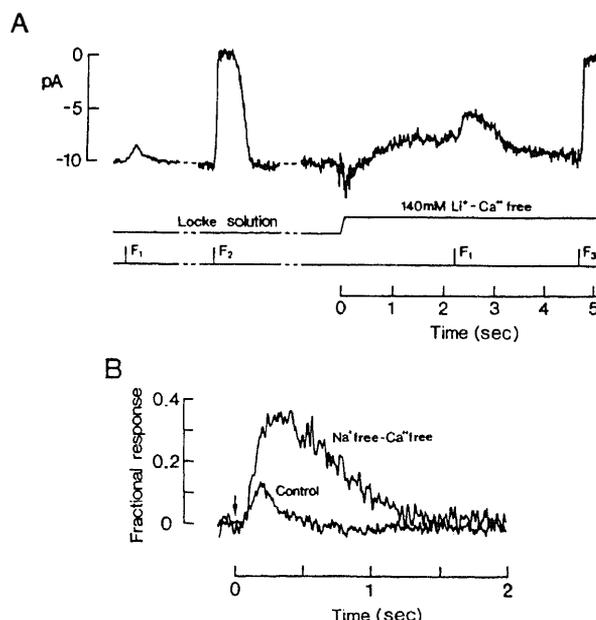


Fig. 9. Effect of removing the Ca²⁺ feedback on dim flash sensitivity in an isolated rod of *M. mulatta*. A. Dim and bright flashes were delivered to measure light sensitivity and dark current in Locke solution and Na⁺ free-Ca²⁺ free solution. The dim flash response and bright flash response in Locke solution represent the averages of eight and two trials, respectively. Responses in 140mM Li⁺ solution were averages of two trials. The flash F₁, F₂ and F₃ delivered 9.8, 280 and 370Rh*, respectively. Bandwidth was DC~40Hz. 37.0°C. B. Comparison of the dim flash responses in the two solutions in A. Arrow indicates the timing of the flashes. Both responses are normalized against the respective dark currents. The slow drift of the dark current in 140mM Li⁺ solution was corrected for by a linear-trend removal. Rod 4 in Table 3.

Caf の変化が光に対する感受性に影響することが明らかになった。同様の実験を、図9に示すアカゲザルの実験結果の他に、さらに3個のカニクイザルの杆体と1個のアカゲザルの杆体においても行い、Ca フィードバックを無効にした状態での光応答の対照光応答に対する振幅比と頂点潜時比としてそれぞれ約2.3と約1.8の各値を得た。これらの値は両生類の杆体と錐体における同様の実験結果^{49)~47)}に極めて近似しており、種の相違をこえて明順応現象の基礎に存在するCa フィードバック機構の類似性が示唆される。なお杆体外節周囲を無Na-無Ca液で灌流すると徐々に杆体の暗電流が減少したので、無Na-無Ca液灌流下で微弱フラッシュ光に対する光応答を5回以上安定して記録することは不可能であった。

IV. 暗時におけるcGMPの代謝率

微弱フラッシュ光により生じる光応答に対するCa フィードバックの効果を定量的に評価する目的で、Cafの増大によりグアニル酸シクラーゼ活性が抑制を受けるCa フィードバックの機序のみが順応効果をもたらすという簡易なモデルを構築し、そのモデルより導かれる光応答波形と実波形の異同を比較・検討した。シミュレーションにあたってまず暗時におけるcGMPの代謝率(β_0)が必要となる。 β_0 の値はHodgkinら¹⁷⁾の方法に準じて、cGMPの合成を停止させた際の暗電流の減少率から求められた。グアニル酸シクラーゼ活性はCafに極めて鋭敏に反応することが判明している¹⁸⁾¹⁹⁾、Cafを増大させることによりすみやかにグアニル酸シクラーゼ活性を抑えることができる。本報では灌流液中よりNa⁺を除くことにより、すな

わち灌流液をロック液よりリチウムロック液あるいはグアニジウムロック液に置換することにより、Na-Ca交換機構を停止させCafを増大させた。この条件下ではGの時間変化率は(28)式の如く表記される。

$$\frac{dG}{dt} = \alpha' - \beta_0 \cdot G \quad (28)$$

(28)式の α' は高Caf状態においてわずかに残存するグアニル酸シクラーゼ活性を反映する小さなcGMP合成率である。しかし実際の実験結果では高Caf状態における暗電流は殆ど観察できない程度に減弱したので、 α' は極めて小さい値であると考えられる。この結果をふまえ(28)式は(29)式に置き換えられる。

$$\frac{dG}{dt} = -\beta_0 \cdot G \quad (29)$$

cGMP感受性チャネルを通る膜電流(jch)の時間変化率は(7)式を修飾した(30)式で表される。

$$\frac{djch}{dt} = -n \cdot J_{max} \cdot \frac{G^{n-1}}{Kch^n} \cdot \frac{dG}{dt} \quad (30)$$

(29)式および(30)式より(31)式が導かれる。

$$\frac{djch}{dt} = -n \cdot \beta_0 \cdot jch \quad (31)$$

すなわちjchは(32)式で示される時定数(τ_0)に従って、経時的

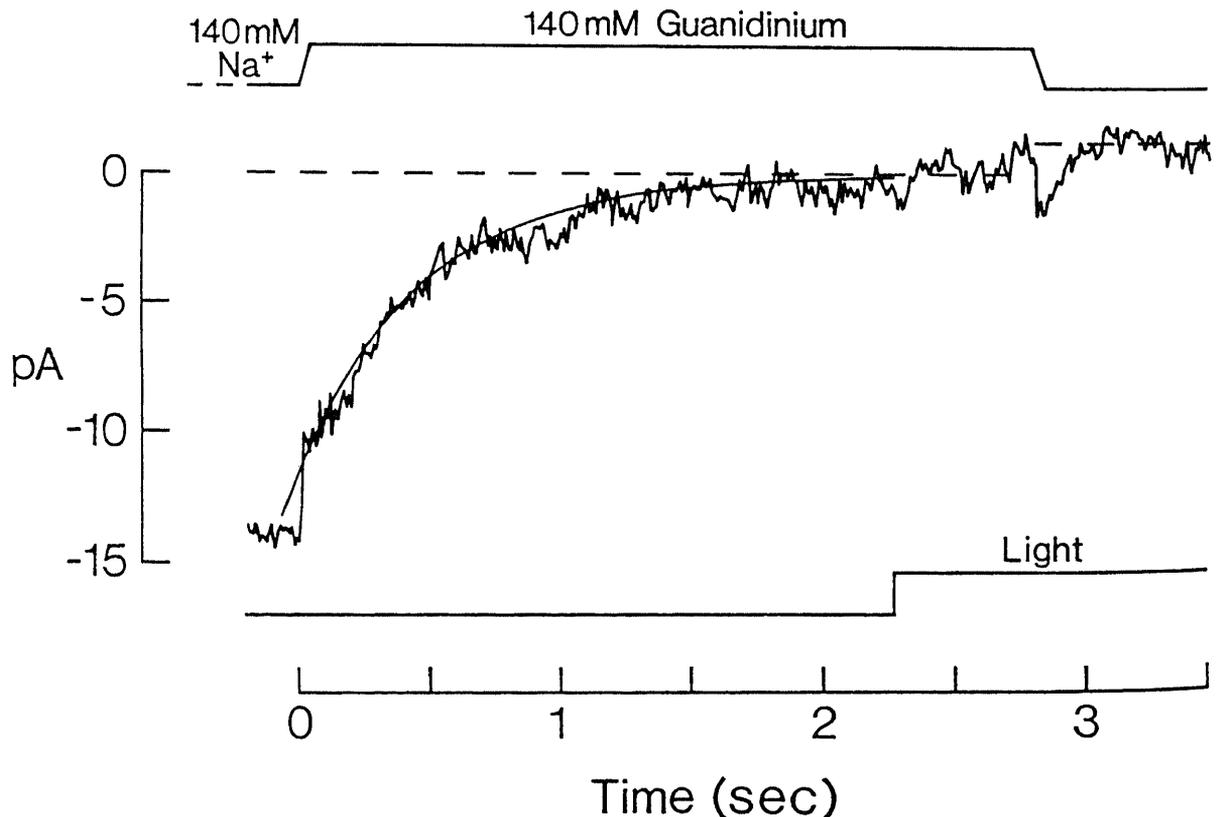


Fig.10. Decline of the dark current after removing external Na⁺. The inner segment of an isolated rod of *M. fascicularis* was sucked into a pipette. The slight shift in baseline upon restoring Na⁺ was due to an incomplete removal of junction current. Smooth curve is an exponential decline curve with a time constant of 480msec. Step of light delivered 12000Rh*·sec⁻¹. Bandwidth was DC~50Hz. 38.0°C.

に指数関数的に減弱すると予測される。

$$\tau_0 = \frac{1}{n \cdot \beta_0} \quad (32)$$

図10はカニクイザルの杆体を用いて行った上述の実験結果の一例を示す。単離した杆体の内節を微小電極内に吸引・保持し、外節周囲の灌流液をロック液からグアニジウム-ロック液へ次いで再びロック液へと変換した。ロック液からグアニジウム-ロック液へ置換した直後に観察される暗電流の急激な減少は Na^+ とグアニジウムイオンの cGMP 感受性チャネルの透過性の差を反映すると推測される⁹⁾。ついで暗電流は経時的にはほぼ指数関数曲線に従って減弱した。図10の滑らかな曲線で示す指数関数曲線の時定数は 480msec である。図10に示す実験結果では、強矩形波刺激光 ($12000\text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$) により微弱ながら

も光応答がみられたことより、暗電流はグアニジウム-ロック液灌流下で完全に零までには減弱していなかった。しかし他の3個のカニクイザルの杆体と1個のアカゲザルの杆体において行われた同様の実験結果では、強矩形波刺激光に対する光応答が観察されなかったことより、無 Na^+ 液灌流下では暗電流は最終的にはほぼ零に達していたと考えられる。図10に示す実験結果を含めた計5個の杆体の実験結果より得られた時定数 τ_0 の平均値と標準偏差はそれぞれ 345msec と 80msec であった。n を 2.5 とすると (「方法」の M 参照), 32式より β_0 の値として約 1.2sec^{-1} が得られた。

図10に示す実験結果において、強矩形波光の照射下にグアニジウム-ロック液からロック液へ灌流液を再置換すると一過性の小さな内向き膜電流が観察された。灌流液の変換と同時に膜電流の零値 (基準値) が少し上方に移動しているのは灌流液

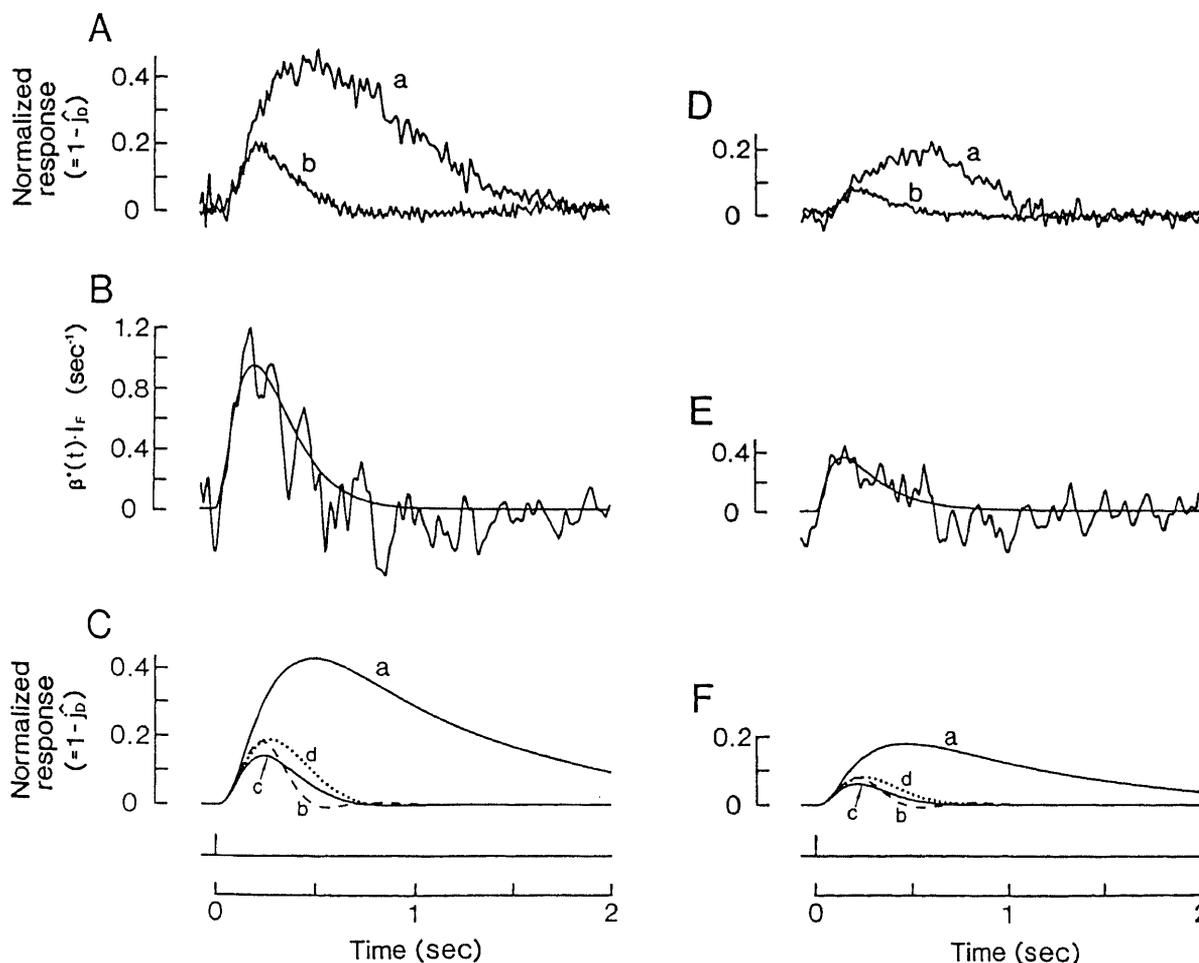


Fig. 11. Same kind of experiment as in Fig. 9 and the flash-triggered phosphodiesterase activities from two isolated rods. Top panels. Traces a and b show the responses to dim flash in Na^+ free- Ca^{2+} free solution and control Locke solution, respectively. Flash was delivered at time zero. (Left column) An isolated rod of *M. fascicularis*. External Na^+ was replaced by guanidinium. Traces a and b were averages of four and eight trials, respectively. Flash intensity was 9.8Rh^* . $36.0 \sim 38.0^\circ\text{C}$. (Right column) An isolated rod of *M. mulatta*. External Na^+ was replaced by Li^+ . Traces a was from a single trial, and trace b was average of fifteen trials. Flash intensity was 5.2Rh^* . 36.5°C . Bandwidth was DC \sim 40Hz in A and D. Middle panels. The time course of dim flash-triggered phosphodiesterase activity, $\beta^*(t) \cdot I_F$, was extracted by applying trace a in top panels to Eq. 35 in the text. Smooth curves were drawn from Eq. 37 in the text with τ of 0.1sec in B and from Eq. 38 in the text with τ_1 of 0.045sec and τ_2 of 0.2sec in E. Bottom panels. Dim flash responses were computed from simulation model with $\beta^*(t) \cdot I_F$ in middle panels. Trace a was computed in the absence of Ca^{2+} feedback. Trace b~d were computed with Ca^{2+} feedback imposed. Trace b was from the model involving two fast Ca^{2+} buffers, trace c, was from two slow Ca^{2+} buffers with Eq. 8 in the text, and trace d was from two slow Ca^{2+} buffers with Eq. 41 in the text.

相間電流の補正が不十分であったことによると考えられる。この一過性の内向き膜電流は、暗時に杆体外節内に取り込まれた Ca^{2+} を細胞外へ排出するように働いた Na-Ca 交換機構の活性を反映する交換電流である⁽⁵⁷⁾⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾⁽⁴⁷⁾。この交換電流を時間軸に沿って積分すると、電荷量 0.32pC の陽イオンが交換電流として細胞内に流入したと計算された。Na-Ca 交換機構の活動により生じる 1 個の陽イオンの細胞内流入は 1 個の Ca^{2+} の細胞外への流出に対応するので⁹⁾、Na-Ca 交換機構により細胞外へ排出される Ca^{2+} の総電荷量は 0.64pC となる。この電荷量は暗時グアニジニウム-ロック液灌流中に細胞内に流入した Ca^{2+} の電荷量にはほぼ一致する。グアニジニウム-ロック液灌流中に観察される内向き膜電流の総電荷量は約 5pC であったので、暗時グアニジニウム-ロック液灌流中に cGMP 感受性チャンネルを通して細胞内に流入する Ca^{2+} による電流は j_{ch_0} の約 13% と計算される。両生類の杆体より得られたグアニジニウムイオンと Na^+ の cGMP 感受性チャンネルの透過率比⁴⁾を勘案すると、生理的条件に近似するロック液灌流中における Ca^{2+} 流入による電流が j_{ch_0} に占める比率は約 10% と計算される。この値は両生類の杆体より得られた 10~15%⁽¹⁰⁾ に近似しており、杆体における cGMP 感受性チャンネルが広い動物種間で類似した性質を有すると推論される。

V. 微弱フラッシュ光により増大するホスホジエステラーゼ活性の時間経過

暗時に杆体外節周囲の灌流液をロック液から無 Na-無 Ca 液に変換することにより、細胞内への Ca^{2+} の流入と細胞外への Ca^{2+} 流出を止め、Caf を暗時の定常値 (Caf_0) に固定すると、(17)式は(33)式に置換される。またこの状態では交換電流 (j_{ex}) は消失するので、観察記録される膜電流 (j) は j_{ch} に等しくなる。

$$\frac{dG}{dt} = \beta_0 \cdot G - [\beta_0 + \beta^*(t) \cdot I_t] \cdot G \quad (33)$$

上記の如く Caf を Caf_0 に固定した状態では微弱フラッシュ光 (I_t) により増大するホスホジエステラーゼ活性 $\beta^*(t) \cdot I_t$ は(33)式と(30)式から導かれる(34)式で表現される。

$$\beta^*(t) \cdot I_t = \beta_0 \cdot \hat{j}_{\text{ch}}^{-1/n} - \frac{d\hat{j}_{\text{ch}}/dt}{n \cdot \hat{j}_{\text{ch}}} - \beta_0 \quad (34)$$

(34)式において \hat{j}_{ch} は上記の状態での光応答中の膜電流 j_{ch} を暗

時の膜電流値 (j_{ch_0}) で除して正規化した膜電流である。 $n = 2.5$ および $\beta_0 = 1.2 \text{sec}^{-1}$ (前項参照) を(34)式に代入して(35)式が得られる。

$$\beta^*(t) \cdot I_t = 1.2 \cdot (\hat{j}_{\text{ch}}^{-0.4} - 1) - \frac{d\hat{j}_{\text{ch}}/dt}{2.5 \cdot \hat{j}_{\text{ch}}} \quad (35)$$

すなわち暗時に杆体内節を微小電極内に吸引・保持した後に外節周囲の灌流液を無 Na-無 Ca 液に変換し、ついで微弱フラッシュ光 (I_t) を照射すると(35)式より I_t によって増大するホスホジエステラーゼ活性 $\beta^*(t) \cdot I_t$ の時間経過が求められる。図 11 中段に上述の解析方法により得られた $\beta^*(t) \cdot I_t$ を示す。図 11A は単離したカニクイザルの杆体を用いて図 9 の実験と同様の実験を行った結果を示す。図 11A の波形 a は無 Na-無 Ca 液の灌流により Ca フィードバックを抑制した状態での、また波形 b はロック液灌流下での微弱フラッシュ光 (9.8Rh*) に対する光応答のそれぞれ 4 回と 8 回の加算平均波形である。両波形とも図 9B に示す波形と同様に、それぞれの状態での暗電流値で除して正規化して表示されている。波形 a に(35)式を適用して $\beta^*(t) \cdot I_t$ を求めるに際して、まず時間枠を 70msec として単純移動平均法により波形 a を平滑化しさらに j_{ch_0} で除して正規化し、これを \hat{j}_{ch} とした。ついで一次微分演算処理と平滑化処理を併せもつ(35)式⁽⁸⁾に \hat{j}_{ch} を代入して $d\hat{j}_{\text{ch}}/dt$ を得た。

$$\frac{d\hat{j}_{\text{ch}}(t)}{dt} = \frac{-2\hat{j}_{\text{ch}}(t-2\Delta t) - \hat{j}_{\text{ch}}(t-\Delta t) + \hat{j}_{\text{ch}}(t+\Delta t) + 2\hat{j}_{\text{ch}}(t+2\Delta t)}{10\Delta t} \quad (36)$$

図 11B の滑らかなでない波形は上記の \hat{j}_{ch} と $d\hat{j}_{\text{ch}}/dt$ を(35)式に代入して得られた $\beta^*(t) \cdot I_t$ の実波形である。この杆体における $\beta^*(t)$ は光刺激の約 0.2 秒後に一過性の頂点を形成し、その頂点振幅は約 $0.1 \text{sec}^{-1} \cdot \text{Rh}^{-1}$ であった。 $\beta^*(t) \cdot I_t$ をより滑らかな時間経過を示す波形で表現しそれを微弱フラッシュ光による光応答のシミュレーションに用いる目的で、 $\beta^*(t) \cdot I_t$ の実波形に近似する滑らかな波形のコンボリューション関数表現⁽⁸⁾を試みた。光受容から cGMP の加水分解までの過程は生化学的研究より 3 段階の酵素反応の活性化によることが判明している。すなわちロドプシン分子が光受容により異性化すると G 蛋白質が活性化される。ついで活性化 G 蛋白質はホスホジエステラーゼ

Table 3. Collected parameters of the convolution function to fit the waveform of $\beta^*(t)$

Rod	τ_1	τ_2	τ_3	t_{peak}	β^*_{peak}	$\int \beta^*(t)dt$
	sec	sec	sec	sec	$\text{Rh}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$	Rh^{-1}
1	0.100	0.100	0.100	0.20	0.098	0.036
2	0.100	0.100	0.100	0.20	0.047	0.017
3	0.135	0.135	0.135	0.27	0.120	0.060
4	0.080	0.080	0.080	0.16	0.091	0.027
5	0.045	0.045	0.200	0.15	0.070	0.026
			Mean	0.196	0.0852	0.0332
			S.D.	0.047	0.0278	0.0164

τ_1 , τ_2 and τ_3 are the three exponential time constants of the convolution function for three reactions in cyclic GMP cascade. t_{peak} is the time to peak of $\beta^*(t)$. β^*_{peak} is the value of $\beta^*(t)$ at t_{peak} .

を活性化し細胞内の cGMP 濃度が減少する。これら活性化したロドプシン分子、G蛋白質およびホスホジエステラーゼがそれぞれの定常状態へ指数関数的に不活化すると仮定し、 $\beta^*(t) \cdot I_i$ を⑦式あるいは⑧式の如く3段階のコンポリューション関数によって表記されるとする。

$$\beta^*(t) \cdot I_i = k \cdot (t/\tau)^2 \cdot \exp(-t/\tau) \quad (37)$$

$$\beta^*(t) \cdot I_i = k \cdot [(1/\tau_1 - 1/\tau_2) \cdot t - 1] \cdot \exp(-t/\tau_1) + k \cdot \exp(-t/\tau_2) \quad (38)$$

⑦式では活性化したロドプシン分子、G蛋白質およびホスホジエステラーゼが同一の時定数 τ で不活化すると仮定し、⑧式ではロドプシン分子とG蛋白質が時定数 τ_1 で不活化し、またホスホジエステラーゼが時定数 τ_2 で不活化すると仮定した。図11Bの滑らかな波形は、⑧式より得られた $\beta^*(t) \cdot I_i$ の実波形に近似するように時定数 τ を 0.1sec として⑦式より導出された波形である。しかしながら⑦式または⑧式の如く $\beta^*(t) \cdot I_i$ がコンポリューション関数で表記されるという仮定は以後のシミュレーションを容易にする目的で設定されたのであり、⑧式より得られた $\beta^*(t) \cdot I_i$ の滑らかでない波形は特に数式表現される必要がないことを付記する。

単離したアカゲザルの杆体を用いて上記と同様の実験と解析を行った結果を図11DとEに示す。この杆体には光強度が 5.2 Rh* の微弱フラッシュ光を照射したので、図11Dの光応答の振幅は図11Aのそれに比べ小さいが、図11AおよびBに示すカニクイザルの杆体の結果に類似した結果が得られた。なお図11Eの $\beta^*(t) \cdot I_i$ の滑らかな波形は⑧式を用い、その時定数 τ_1 および τ_2 をそれぞれ 0.045sec と 0.2sec として得られた波形である。同様の実験と解析をさらに他の3個のサル杆体(2個のアカゲザル杆体と1個のカニクイザル杆体)においても行い、これら5個の杆体における $\beta^*(t)$ をコンポリューション関数表現した際のロドプシン分子、G蛋白質およびホスホジエステラーゼの時定数と定数値を表3にまとめた。5個の $\beta^*(t)$ の頂点振幅の平均値は約 $0.09 \text{sec}^{-1} \cdot \text{Rh}^*^{-1}$ であり、また $\int \beta^*(t) dt$ の平均値は約 0.033Rh^*^{-1} であった。 $\int \beta^*(t) dt$ は1個のロドプシン分子の光異性化により増大する cGMP の加水分解率を積分した値であり、矩形波光刺激に対する光応答のシミュレーションに利用された(次項参照)。

VI. Ca フィードバックの微弱フラッシュ光応答への影響

前項までの定量的実験結果より、微弱フラッシュ光照射による光応答のシミュレーションに必要な全ての情報が得られた。これらをシミュレーションモデルを記述する数式に適用した。前述のように本報のシミュレーションモデルにおいてはCaフィードバックによってのみ明順応現象が発現するので、モデルより導出される微弱フラッシュ光応答を実波形と比較することにより、サル杆体におけるCaフィードバックの明順応への関与を間接的に推測することが可能となる。まず前項の解析によって得られた微弱フラッシュ光 (I_i) により生ずる $\beta^*(t) \cdot I_i$ をコンポリューション関数で表現した式(図11BおよびEの滑らかな曲線に対応)を(7)式と(3)式に代入して微弱フラッシュ光応答のシミュレーション波形を求めた。その結果を図11下段の波形aに示す。シミュレーションは図11上段の波形aが観察された杆体外節の状態を模倣してCafをCaf₀に固定した状態を仮定してなされ、微弱フラッシュ光応答のシミュレーション波形が導出された。図11上段の波形aを解析して

$\beta^*(t) \cdot I_i$ が求められたので、必然的に図11上段の波形aと図11下段の波形aは互いに近似するが、光応答の回復過程にやや差異がみられる。図11中段の $\beta^*(t) \cdot I_i$ の実波形の回復過程にわずかであるが基線を越えるアンダーシュートが観察される。同様のアンダーシュートは解析に用いた5個のサル杆体より得られたすべての $\beta^*(t) \cdot I_i$ に認められたが、これが真の $\beta^*(t) \cdot I_i$ の時間経過を表すのか、あるいは実験方法も含め他の原因によるのかは不明である。本報では $\beta^*(t) \cdot I_i$ を記述するのに⑦式あるいは⑧式の如くコンポリューション関数を用いたので、 $\beta^*(t) \cdot I_i$ の実波形とコンポリューション関数で表現された $\beta^*(t) \cdot I_i$ の回復過程に若干の差異がみられる。この差異が図11上段の波形aと図11下段の波形aの回復過程の差異として現れたと考えられる。

Caフィードバックの効果が発現すると推測されるロック液灌流下の生理的条件下での微弱フラッシュ光応答のシミュレーション波形を下記のように導出した。まず細胞内のCa緩衝系が急速Ca緩衝系(「成績」のII参照)であると仮定して、(5)式、(7)式、(8)式、(17)式、(18)式、(24)式にコンポリューション関数で表現された $\beta^*(t) \cdot I_i$ を適用した。これらの式中の定数値として前述の如く $K_{ch} = 50 \mu\text{M}$, $J_{exc} = 6.5 \text{pA}$, $K_{ex} = 1.65 \mu\text{M}$, $V = 30 \mu\text{m}^3$, $K_{cy} = 0.1 \mu\text{M}$, $m = 4$, $n = 2.5$, $\beta_0 = 1.2 \text{sec}^{-1}$ および表2Aの平均値を、また暗時の定常状態を表す初期値として $\text{Caf}_0 = 0.3 \mu\text{M}$, $G_0 = 7.9 \mu\text{M}$, $j_{ch_0} = 20 \text{pA}$, $j_{ex_0} = 1 \text{pA}$ ($j_0 = j_{ch_0} + j_{ex_0} = 21 \text{pA}$) を採用した。これらの設定のもとに行ったシミュレーションの結果を図11下段の波形bに示す。図11下段の波形bは図11上段の波形bの生理的条件下における微弱フラッシュ光応答に近似するが、回復過程に負のフィードバックの特徴の一つである律動性の振幅変化を呈する。しかし図11上段の波形bにはこのような律動性の変化はみられない。つぎに細胞内に緩徐Ca緩衝系(「成績」のII参照)の存在を仮定して、コンポリューション関数で表現された $\beta^*(t) \cdot I_i$ を(7)式、(8)式、(17)式、(18)式、(26)式、(27)式、(39)式に適用して行ったシミュレーションの結果を図11下段の波形cに示す。緩徐Ca緩衝系の性状を規定する(26)式と(27)式中の各定数値として表2Bの平均値を採用した。

$$\frac{d\text{Caf}}{dt} = \frac{1}{F \cdot V} \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot \text{Pca} \cdot j_{ch} - j_{ex} \right) - \frac{d\text{Cab}_1}{dt} - \frac{d\text{Cab}_2}{dt} \quad (39)$$

このシミュレーションに際し、(7)式、(8)式、(17)式、(39)式中の各定数値および暗時の定常状態を表す初期値に前述の急速Ca緩衝系を仮定した場合と同一の値を採用した。図11下段において波形cでは波形bに比べ、回復過程は図11上段の波形bのそれにより近似したが、頂点振幅はやや減弱した。図11下段の波形dは細胞内に緩徐Ca緩衝系の存在を仮定し、さらに細胞内の状態がある電気化学的平衡状態に達するとNa-Ca交換機構が停止すると仮定(「成績」のVI参照)して得られたシミュレーション波形を示す。すなわち(7)式、(17)式、(18)式、(26)式、(27)式、(39)式、(41)式にコンポリューション関数で表現された $\beta^*(t) \cdot I_i$ を適用し、微弱フラッシュ光 (I_i) 照射による光応答のシミュレーション波形を導出した。なお緩徐Ca緩衝系の性状を規定する(26)式と(27)式中の各定数値として表2Cの平均値(「成績」のVII参照)を、また(7)式、(17)式、(39)式、(41)式中の各定数値および暗時の定常状態を表す初期値に前述の急速Ca緩衝系を仮定した場合と同一の値を採用した。

図11下段の波形 b, c および d はともに図11上段の波形 b にかなり近似したことから, サル杆体においても生理的状态では Ca フィードバックは光応答を修飾する, すなわち明順応効果を惹起すると推論される. ただシミュレーションにより得られた微弱フラッシュ光応答波形から判断すると, 図11下段の波形 d が導き出された仮定が最も杆体外節内の生理的機序に近いように見える.

Ⅶ. Ca フィードバック・モデルより導出される矩形波光応答のシミュレーション

前項と同様に Ca フィードバックによってのみ明順応効果が発現されるという仮定のもとに, 矩形波光応答のシミュレーションを行った. シミュレーションにあたり, 1 個の光異性化したロドプシン分子 (Rh^*) により活性化されるホスホジエステラーゼ活性 $\beta^*(t)$ に対して以下の如く仮定した. 個々の Rh^* による個々の $\beta^*(t)$ は相互に干渉することなく独立して発生し, Caf によっても影響されない. また $\beta^*(t)$ を (8) 式のコンポリューション関数で表現し, 「成績」の V の結果をふまえて (8) 式の k と τ をそれぞれ 0.166 と 0.1 sec として $\int \beta^*(t) dt$ の値を 5 個のサル杆体の実験より得られた $\int \beta^*(t) dt$ の平均値 ($0.033 Rh^*$) に合致させた. この条件では $\beta^*(t)$ の頂点振幅は実験より得られた $\beta^*(t)$ の平均値 ($0.09 sec^{-1} \cdot Rh^*$) に近似した.

図12に上記の仮定より得られた矩形波光応答のシミュレーション波形を示す. 前項と同様にして細胞内に急速 Ca 緩衝系を仮定して図12A の, また緩徐 Ca 緩衝系を仮定して図12B の矩形波光応答のシミュレーション波形が得られた. 矩形波光応答のシミュレーション波形においても急速 Ca 緩衝系の仮定のもとでは光応答初期に漸減現象に重畳して律動的な振幅変化がみられる (図12A). 一方, 緩徐 Ca 緩衝系を仮定した矩形波光応答のシミュレーション波形では約 1 秒で平坦部にはぼ到達する実験結果に近い漸減現象がみられる (図12B). しかし図12B

の漸減現象の大きさは実測された漸減現象に比較すると小さい (「成績」の I 参照).

図12A と B の矩形波光応答のシミュレーション波形はともに 30, 300, 3000 および 30000 $Rh^* \cdot sec^{-1}$ の光強度の矩形波光照射を仮定して導出された. 矩形波光応答が平衡状態に安定した状態における Caf は, 細胞内 Ca 緩衝系が急速 Ca 緩衝系かあるいは緩徐 Ca 緩衝系かに関係なく決定されるので, 矩形波光応答平坦部の振幅は図12A と B において同一の値となる. この平衡状態における f_s 対 I_s の関係を図13A の曲線 1 に示す. 図13A の破線は (9) 式に従って描かれた曲線であり, 明順応が存在しない状態での f_s 対 I_s の関係を記述する (「成績」の I 参照). 実験より得られた f_s 対 I_s の関係 (図4) と同様に, 光強度が大きくなるにつれ曲線 1 は破線より偏位し, より緩やかな f_s 対 I_s の関係を示す. なお微弱な矩形波光照射時における破線と曲線 1 の f_s は一致すると仮定して, 破線の水平方向の位置を設定した. 曲線 1 に示すシミュレーション結果では, 矩形波光応答平坦部の振幅が飽和振幅の半分となる矩形波光強度は実験結果 (表1参照) に比較してやや高値の約 800 $Rh^* \cdot sec^{-1}$ であった. 曲線 1 において, 矩形波光応答振幅が飽和振幅の 70% に達する付近より曲線の傾きが, 低強度の光照射時の傾きに比較して急峻に増大する変化がみられる. 曲線 1 の傾きのこうした変化はグアニル酸シクラーゼ活性 (α) と Caf の関係を規定した (10) 式 [あるいは (12) 式] より説明される. 矩形波光強度が増大するにつれ, 矩形波光応答平坦部の振幅は増大し Caf は減少する. この Caf の減少に伴う α の増大率 $-d\alpha/dCaf$ (言い換えると, 個々の Caf 値における Ca^{2+} の α に対する抑制効果) が (10) 式より導かれる. Caf が暗時の Caf_0 より減少していくと, $-d\alpha/dCaf$ は増大し (40) 式で示される Caf 値 (Caf^*) の時に最大となる. ついで $-d\alpha/dCaf$ は徐々に減弱するが, Caf が Caf_0 から 0 の間にある限りにおいて正の値を示す. この Caf と $-d\alpha/dCaf$

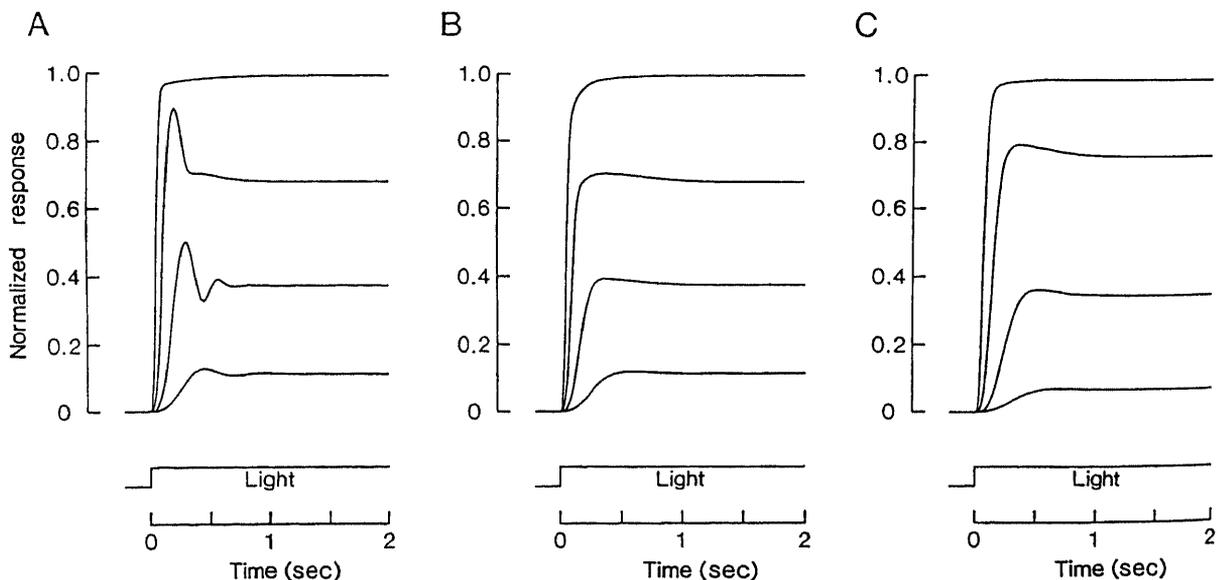


Fig. 12. Simulated response families to steps of light. Family in A was computed from the model involving two fast Ca^{2+} buffers, family in B was from two slow Ca^{2+} buffers with Eq. 8, and family in C was from two slow Ca^{2+} buffers with Eq. 41 in the text. Intensities of steps of light used for calculations were 30, 300, 3000 and 30000 $Rh^* \cdot sec^{-1}$ in A and B, and 10, 100, 1000 and 10000 $Rh^* \cdot sec^{-1}$ in C.

dCaf の関係は Koch ら¹⁸⁾の結果(彼らの論文中の図1参照)より理解される。

$$Caf^* = Kcy \cdot [(m-1)/(m+1)]^{1/m} \quad (40)$$

(40)式において $m = 4$, $Kcy = 100nM$ の各値を代入すると(「方法」のM参照), Caf^* は $88nM$ となる。矩形波光強度と矩形波光応答平坦部における Caf 値は上記のシミュレーションより直接導出され, Caf が Caf^* に一致する際の矩形波光強度は約 $3000Rh^* \cdot sec^{-1}$ であると判明した。すなわち矩形波光の強度を強めるにつれて Caf が減少し, これにより $-d\alpha/dCaf$ は増大するが, 図13Aの曲線1上の矢印で示された約 $3000Rh^* \cdot sec^{-1}$ より強い強度の矩形波光照射では $-d\alpha/dCaf$ は低下し cGMP 合成能が減弱する。このことが矢印で示された光強度より強い光照射による曲線1の急峻な傾き増大に反映する。実測より得られた \hat{r}_s 対 I_s の関係(図4)を, 個々の杆体の結果について再検討すると, 少数ではあるが \hat{r}_s 対 I_s の関係において曲線1に類似した急峻な傾きの増大を示す杆体が存在した。この事実から実際のサル杆体においても上述の機構の存在が示唆される。しかし大多数の杆体における \hat{r}_s 対 I_s の関係には急峻な傾きの増大がみられなかったので, シミュレーションより得られる \hat{r}_s 対 I_s の関係に上記の急峻な傾きの増大が現れないように以下の通りモデルを変更した。すなわちいかに強い光照射によっても Caf は Caf^* 以下には減少しないという仮定を加えた。強い光照射により全ての cGMP 感受性チャネルが閉鎖した状態では, 外節内の Caf は Na-Ca 交換機構の活性によって規定される。Cervetto ら³⁰⁾は視細胞外節の Na-Ca 交換機構により細胞膜内外で交換されるイオン数の比率(4個の Na^+ の細胞内への流入に対して1個の Ca^{2+} と1個の K^+ が細胞外へ排出される)より, Na-Ca 交換機構のみが細胞内外のイオンの流れを決定する平衡状態(すなわち強い光の持続照射下)では Caf は約 $0.2nM$ に達すると推論した。しかし Ratto ら¹⁴⁾による強い光照射時の Caf の実測値(約 $140nM$)は Cervetto らの理論値(約 $0.2nM$)に比較してかなり高値であった。両者の値の差異には少なくとも以下の2つの因子の関与が考えられる。Cervetto ら³⁰⁾は Na^+ , K^+ , Ca^{2+} の陽イオンと Na-Ca 交換機構の蛋白分子との時間当りの結合率を考慮することなく, 単に Na^+ , K^+ , Ca^{2+} の細胞内外の濃度より上記の $0.2nM$ の Caf 値を得たが, 実際には Caf が低濃度の場合には Ca^{2+} が Na-Ca 交換機構の蛋白分子に時間当りに結合する率はかなり低いと予想されるので, 生理的条件下での強い光照射時の Caf は $0.2nM$ の理論値より高いと推測される。また細胞内に Ca^{2+} 貯蔵庫が存在し, Caf が極端な低濃度にならないようにそこから Ca^{2+} が放出されている可能性も考えられる。その亜型として, たとえば視細胞内節より外節内へ Ca^{2+} が流入する可能性があげられる。以上の議論を踏まえ, Caf が Caf^* より高いある濃度 C_0 以下には低下しないようにするべく, (8)式を(4)式で置換した。

$$j_{ex} = J_{exc} \cdot \frac{Caf - C_0}{(Caf - C_0) + K_{ex}} \quad (41)$$

Ratto ら¹⁴⁾による強い光照射時の Caf の実測値(約 $140nM$)を参考に C_0 の値として, Caf^* より高値でありかつ(4)式を簡素にするように K_{ex} と同一の $0.1\mu M$ を採用した。(4)式は(8)式と同様にミカエリスメンテンの式に準拠しており, また(8)式の根拠となった Cervetto ら³⁰⁾の実験で用いられた比較的高濃度の

Caf の条件下では, (4)式中の C_0 は Caf に比較して相対的に無視されるので, (4)式は Cervetto ら³⁰⁾の実験結果にもほぼ合うものである。また(4)式は, 常に内節から外節へ(4)式で記述される一定率の Ca^{2+} の流入(L)があると仮定することによって, 以下の如く解釈される。

$$L = \frac{C_0}{C_0 + K_{ex}} \quad (42)$$

強い光の持続照射により全ての cGMP 感受性チャネルが閉じ Caf が C_0 にまで低下すると, 時間あたりに Na-Ca 交換機構により細胞外に排出される Ca^{2+} 量は内節からの Ca^{2+} 流入率Lに一致するので, Caf は C_0 以下に減少することはない。すなわち正味の細胞外への Ca^{2+} 排出率(E)は下記で記述されることになる。

$$E \propto \frac{Caf}{Caf + K_{ex}} - L = \frac{Caf}{Caf + K_{ex}} - \frac{C_0}{C_0 + K_{ex}}$$

$$\propto \frac{Caf - C_0}{(Caf - C_0) + (K_{ex} + C_0)}$$

$$\approx \frac{Caf - C_0}{(Caf - C_0) + K_{ex}} \quad (C_0 \ll K_{ex} \text{ の時})$$

もし上記の仮定が正しいならば, これまで交換電流として実測

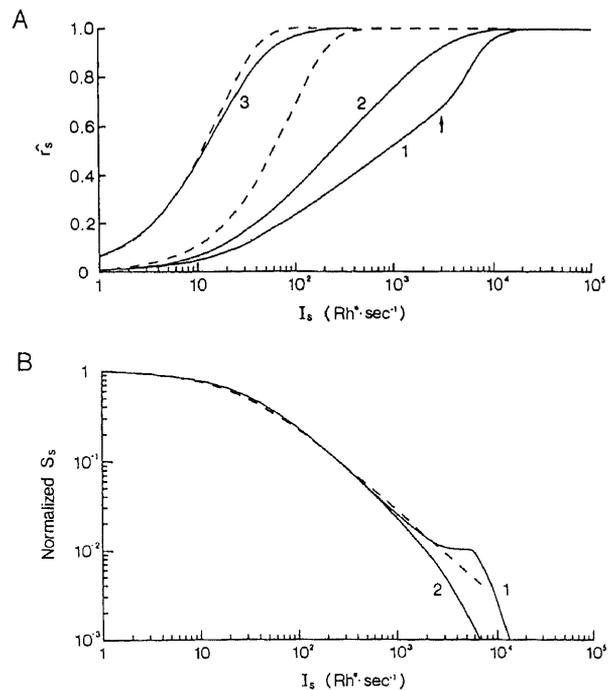


Fig. 13. A. Simulated response-intensity relation in steady state of step responses. Curve 1 corresponds to the situation in Fig. 12A and B. Curve 2 corresponds to the situation in Fig. 12C. Curve 3 was drawn from Eq. 44 in the text. Both dashed curves were drawn from Eq. 19 in the text, but shifted to different positions on the abscissa to coincide with curves 1 (and 2) and 3 at low intensities. Arrow is at $3000Rh^* \cdot sec^{-1}$ in step light intensity. B. Simulated step sensitivity (S_s) on background lights, calculated as $\Delta \hat{r}_s / \Delta I_s$ from curves 1 and 2 in A. Step sensitivity was normalized by the value of S_s at $0.1Rh^* \cdot sec^{-1}$. Dashed curve was drawn from Eq. 20 in the text, showing Weber-Fechner relation.

されていた内向き電流 j_{ex} は E を直接に反映する値となる。そこで(8)式の代わりに(4)式を用い、また細胞内に緩徐 Ca 緩衝系の存在を仮定して交換電流のシミュレーションを試みた。(25)式~(27)式と(4)式を用い、細胞内の2種類の Ca 緩衝系の R_{t1} , K_{d1} , R_{t2} および K_{d2} に任意の値を与え、また J_{exc} に近似した交換電流を出力するに足る十分大きな C_{af} の初期値を代入することによって理論的 j_{ex} が得られる。こうして得られた理論的 j_{ex} は、 R_{t1} , K_{d1} , R_{t2} および K_{d2} の各値を増減することにより、成績の II で示した交換電流の実波形にきわめて近似する。図6および図7で示した実験方法により得られた5個のサル杆体の交換電流の時間経過に理論的 j_{ex} の時間経過が合うように R_{t1} , K_{d1} , R_{t2} および K_{d2} の各値を求め、その結果を表2Cにまとめた。 j_{ex} のシミュレーションにあたり、「成績」のIIにおける緩徐 Ca 緩衝系の仮定と同様に $K_{a11}=20\text{sec}^{-1}$, $K_{a12}=5\text{sec}^{-1}$ と設定した。図11下段の波形 d と図12Cの各波形は表2Cの R_{t1} , K_{d1} , R_{t2} および K_{d2} の各平均値を用いて導出された微弱フラッシュ光応答と矩形波光応答のシミュレーション波形である。図12Cのシミュレーション波形は図12AとBの波形と異なり10, 100, 1000, 10000 $\text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ の強度の矩形波照射を仮定して導かれた。図13Aの曲線2は、これらシミュレーション波形の光応答平坦部における \hat{f}_s 対 I_s の関係を示しており、強い光照射によっても急峻な曲線の傾き増大はみられない。曲線2において、矩形波光応答平坦部の振幅が飽和振幅の半分となる矩形波光強度は約 $250\text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ であり、実験結果に近似した(表1参照)。

ついで視細胞外節周囲の灌流液をロック液より無 Na-無 Ca 液に置換して C_{af} を暗時の定常値 (C_{af0}) に固定した状態を仮定して、Ca フィードバックの作動しない状態での \hat{f}_s 対 I_s の関係をモデルより導出した。この環境下で矩形波光応答振幅が平坦となった平衡状態では $dG/dt=0$ が成立するので、(17)式より矩形波光応答平坦部における G は(43)式で記述される。

$$G = \frac{\beta_0 \cdot G_0}{\beta_0 + I_s \cdot \int \beta^*(t) dt} \quad (43)$$

無 Na-無 Ca 液の灌流により Na-Ca 交換機構が停止しているので、観察される膜電流 j は j_{ch} に等しい。すなわち光応答の飽和振幅で除して正規化された矩形波光応答 \hat{f}_s は下記で記述される。

$$\begin{aligned} \hat{f}_s &= 1 - j/j_0 \\ &= 1 - j_{ch}/j_{ch0} = 1 - [G/G_0]^n \\ &= 1 - \left[\frac{\beta_0}{\beta_0 + I_s \cdot \int \beta^*(t) dt} \right]^n \end{aligned} \quad (44)$$

図13Aの曲線3は(44)式に $n=2.5$, $\beta_0=1.2\text{sec}^{-1}$ および $\int \beta^*(t) dt=0.033\text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ を代入して得られた。図13Aの曲線1, 2と同様に曲線3においても、個々の Rh^* によるホスホジエステラーゼ分子の活性化 $[\beta^*(t)]$ は互いに独立しておこり、光により増大するホスホジエステラーゼ活性に順応はみられないという仮定が用いられた。図13Aより明らかなように曲線3は破線で示された指数関数曲線に近似する。サル杆体はサンショウウオ杆体に比べ脆弱であり、上述のように C_{af} を長時間 C_{af0} に固定した状態で矩形波光応答を記録できなかったため、図13Aの曲線3を実験結果と直接に比較検討することは不可能であった。しかし図13Aの曲線2と曲線3においてそれぞれ

の \hat{f}_s が飽和振幅の50%となる光強度の差異は約 $1.2 \log$ であり、サンショウウオ杆体よりの結果⁶⁾に近似した。

図13Aの曲線1, 2の傾き ($d\hat{f}_s/dI_s$) は矩形波光感度 (step sensitivity, S_s) を示す。図13Bの曲線1, 2はそれぞれ図13Aの曲線1, 2より計算された S_s と I_s の関係を示す。縦軸は各光強度下の S_s を極く微弱な光 ($0.1\text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$) 照射下の S_s で除して正規化された値である。図13Bの破線は(20)式で記述されるウェーバー・フェヒナーの関係を表す。図13Bの曲線1には、図13Aの曲線1の強い光照射時にみられる急峻な傾き増大に対応して S_s 対 I_s の関係に急峻な変化を示す部分が出現するが、曲線2にはこのような変化は現れない。しかし曲線1, 2ともに S_s が暗時に近いと推測される $0.1\text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ の微弱光照射下の S_s より約 $2 \log$ 低下するまでの I_s の範囲においてウェーバー・フェヒナーの関係に近似する。また増分フラッシュ光感度 (S_F) と S_s の関係は、積分時間を t_i で表記すると $S_s = S_F \cdot t_i$ で記述される。 I_s を増減した時の t_i の変化は S_s の変化に比較すると有意に小さいので、 S_F は S_s にほぼ比例するといえる。すなわち図13Bの S_s 対 I_s の関係は S_F 対 I_s の関係にほぼ同義であり、サル杆体の S_F 対 I_s の関係の実験結果(図5)と照合することができる。図13Bの曲線1あるいは2より得られた I_0 は約 $35\text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ であり、実験結果(表1)にきわめて近似する。

考 察

I. 霊長類杆体の明順応能

哺乳類動物の杆体が両生類の杆体と同様に明順応するか否かについて、これまで実験の困難さから確証が得られず、多少の混乱があった。しかしながら本報での霊長類杆体の結果も含め、多くの哺乳類の杆体^{21,22)}で明順応現象が存在することが明らかとなった。ただし哺乳類の杆体においては背景光照射下の増分フラッシュ光感度 (S_F) がウェーバー・フェヒナーの関係に従う背景光強度の範囲(以下では動的光量域と略記する)が両生類杆体のそれに比べて狭く、このことがBaylorら²⁰⁾が実験結果の解釈を誤った主因であると考えられる。実際に彼ら²⁰⁾が行った7個のカニクイザル杆体における S_F 対 I_s の関係の実験結果(彼らの論文中の図9)を再検討すると、少なくともそのうちの2個の杆体は明順応の欠如を示す指数関数曲線よりむしろウェーバー・フェヒナーの関係に適合する。杆体の明順応能は、特にネコ、ラットなどの錐体の分布密度の疎な網膜においてはより重要であると推測される。例えばネコ、ラットにおいては錐体系の光閾値は高く、白色光で杆体1個あたり $10^3 \text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ 近い光強度までは杆体機能が優位であると報告されている⁵¹⁾⁻⁵³⁾。これら錐体の分布密度の疎な錐体系の光閾値の高い網膜において、もし杆体に明順応する能力がないと仮定すれば、杆体系のみの機能する暗所視環境から錐体系が十分に機能する明所視環境への移行期すなわち薄明視環境において網膜の光感度に急激な変化がおこると予想される。これは動物にとって環境の明るさの変化に十分に対応できないことになり不都合である。一方、本報で調べたサルあるいはヒトの網膜では錐体が多く、個々の杆体の明順応能はネコ網膜に比べてそれほど重要ではないかもしれない。しかしこれら錐体の多い動物の網膜においても、錐体の比率の少ない周辺部網膜のみが機能する環境あるいは順応光などにより錐体系の感度が選択的に減弱する特殊な環境においては、個々の杆体の明順応能はやはり重

要になると推測される。

本報で用いた4種のサルのうちガーネットガラゴは、他の3種のサルと異なり夜行性のより原始的なサルである。このサル網膜にはこれまで錐体が存在しないと考えられていたが、Wiklerら⁵⁰により昼行性サル網膜に比較すると数は少ないが錐体が存在することが判明し、ガーネットガラゴ網膜の錐体数に対する杆体数の比率は他の3種のサルよりむしろネコのそれに近いものであった。しかし本報の実験で供された4種のサル杆体において、定性的にも定量的にもほぼ同様の明順応現象が観察された。またサル杆体で観察された明順応現象は、さらにネコ、ウサギ、ウソおよびラットの杆体の明順応現象^{21,22})にも近似した。例えば上記の4種の哺乳類および本報で用いた4種のサルの杆体において、 f_s 対 I_s の関係で f_s が飽和振幅の50%になる時の I_s は $120 \sim 400 \text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ であり、 f_s がほぼ飽和振幅に達する時の I_s は $2000 \sim 6000 \text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ であった。また背景光強度を強めるに従い S_F は約 $2 \log$ の動的光量域においてウェーバー・フェヒナーの関係に従って低下した後、背景光に対する応答振幅が飽和値に近づいて急激に低下した。上記8種の哺乳類の杆体においてウェーバー・フェヒナーの関係式における I_0 は $30 \sim 50 \text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ の範囲内にあり、霊長類を含めた哺乳類の杆体は互いにきわめて近似した明順応能を有することが判明した。このような哺乳類における種をこえた杆体の明順応能の類似性は、哺乳類の個々の杆体が暗所視環境下において十分な視機能を有し、かつ動的光量域が約 $2 \log$ であるという点ですでに地上の環境に最適化された結果であると推測される。動的光量域を拡大することと暗所下における光感度を高めることは互いに相反する関係にある。すなわち Ca フィードバックの効果が弱いと仮定すると、 S_F 対 I_s の関係はウェーバー・フェヒナーの関係よりむしろ指数関数曲線に近づくことになり、暗黒および微弱背景光下における光感度は高い状態に保たれるが、 I_s の増大により S_F は急激に低下し動的光量域は狭まる。一方 Ca フィードバックの効果が強い場合には、動的光量域は拡大するものの微弱背景光下における光感度は低下する。これら2つの相反する環境への適合要件を折衷するように哺乳類の杆体が進化を遂げてきたと考察される。杆体が有する約 $2 \log$ の動的光量域に杆体以降の網膜内の神経回路網の明順応能による動的光量域が加わって、杆体系全体として約 $5 \log$ の動的光量域^{29,30})が達成される。またさらに明るい環境においても十分な視機能を有するように、錐体系をも有する哺乳類動物種では杆体機能を著しく変更することなく、明所視環境下では錐体系が杆体系に代わって機能し、杆体系と錐体系を併せて広い動的光量域を形成するように進化したと考えられる。

ウェーバー・フェヒナーの関係式における I_0 値を脊椎動物の杆体について概観すると、カメで約 $0.2 \text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ ⁶¹⁾、ヒキガエルで約 $4 \sim 10 \text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ ^{25,62)}、またサンショウウオで約 $30 \text{Rh}^* \cdot \text{sec}^{-1}$ ⁴⁰⁾と報告されており、おおむね霊長類を含む哺乳類杆体における I_0 値より低値である。 I_0 値の動物種間における差異の一因に、積分時間 (t_i) の差異が推定される。上記の冷血動物の杆体の単一フォトン応答の振幅は哺乳類杆体のそれと比較すると著しい差異はないが、その t_i は有意に延長している。これにより冷血動物杆体の矩形波光応答は哺乳類のそれに比べて同一強度の光照射に対してより大きな応答振幅を呈することになり、 I_0 値が小さくなると推論される。また冷血動物の t_i 値が哺乳類と比較して大きい理由の一つに低体温が上げられる。冷血動物

と哺乳類動物の体温の差異はさらにそれぞれの矩形波光応答における漸減現象の時間経過の差異としても反映される。両生類杆体は室温環境下 ($20 \sim 25^\circ\text{C}$) において約 $5 \sim 10 \text{sec}$ で終了する漸減現象を呈する^{44,45,62)}。一方サル杆体の漸減現象およびウサギ杆体の漸減現象²²⁾ はそれらの体温に近い環境下において約 $1 \sim 2 \text{sec}$ で終了する。ウサギ杆体を $22 \sim 24^\circ\text{C}$ の低温環境におくと漸減現象が終了する時点が約 5sec へと遅延する(未発表)ことより、温度が漸減現象の時間経過を決定する主因と考えられる。漸減現象が温度によって変化する一因として、 Ca^{2+} を細胞外へ排出する Na-Ca 交換機構の温度感受性が推定される。Kimuraら⁶³⁾ はモルモット心筋細胞の Na-Ca 交換機構の活性の温度感受性を検討して、 0mV および 50mV の膜電位における Q_{10} 値はそれぞれ 3.6 と 4.0 であったと報告した。

II. 交換電流と細胞内 Ca 緩衝系

本報によりサル杆体においても両生類杆体と同様に光と無関係に細胞外に Ca^{2+} を排出する Na-Ca 交換機構が存在することが明らかになった。Na-Ca 交換機構の活性によって発生する交換電流の飽和値は有効電流記録率によって補正されると約 6.5pA である。また P_{Ca} が 0.1 (「成績」の V 参照) であったことより、暗時の生理的条件下において約 1pA の交換電流が流れており、暗電流の約 5% は内向き膜電流である交換電流によって構成されると推定される。

サル杆体に大量の Ca^{2+} を充填させた後に交換電流を観察記録した実験(以下では Ca^{2+} 充填実験と略記する)の結果より細胞内に性質を異にする複数の Ca 緩衝系が存在し、これらによって Caf が調節されていることが示唆された。Cervettoら²⁶⁾ はサンショウウオ杆体を用いた Ca^{2+} 充填実験の結果より、Caf は Cat の約 10% であり残りの 90% は細胞内の Ca 緩衝系に結合すると報告した。また Hodgkinら⁷⁾ はサンショウウオ杆体の Ca^{2+} 充填実験の結果より、 Ca^{2+} に対する親和性の異なる2種の Ca 緩衝系を想定することによって Ca^{2+} 充填実験で記録される jex を理論的に導出できると述べた。彼ら⁷⁾ が想定した2種の Ca 緩衝系のうちの1種は常に遊離 Ca^{2+} の 10 倍量の Ca^{2+} が結合する Ca^{2+} に対する親和性の低い Ca 緩衝系であり、他の Ca 緩衝系はその濃度 (Rt) および解離定数 (Kd) がそれぞれ約 $30 \mu\text{M}$ と 30nM である Ca^{2+} に対する親和性の高い Ca 緩衝系である。彼ら⁷⁾ のシミュレーションモデルでは Ca 緩衝系に結合する Ca^{2+} 濃度 (Cab) と Caf は常に平衡状態にあるとするきわめて速い Ca 緩衝系が仮定されており、このシミュレーションモデルから導出される jex の時間経過は Ca^{2+} 充填実験によって記録された jex の実測結果に近似する。しかし Ca^{2+} 親和性の低い Ca 緩衝系に結合する Ca^{2+} 濃度が常に Caf の 10 倍であるとする Hodgkinら⁷⁾ の仮定は、Ca 緩衝系の濃度が無限大であることを要求し非現実的な仮定である。また2種の Ca 緩衝系ともきわめて速い緩衝系であると仮定すると、本報で示した急速 Ca 緩衝系と同様にフラッシュ光応答の回復過程に律動性の振幅変化および矩形波光応答の初期に漸減現象に重畳して律動性の振幅変化(以下では律動性変化と略記する)がシミュレーションにより導出された光応答波形上に表れ、実波形との間に差異が現れると予想される。一方 Fortiら³¹⁾ は細胞内 Ca 緩衝系を単純に1種類のみと仮定して、両生類杆体の光応答に対するシミュレーションモデルを提出した。彼ら³¹⁾ はこのモデルにおいて Ca 緩衝系の濃度と解離定数をそれぞれ $500 \mu\text{M}$ と $4 \mu\text{M}$ とし、Hodgkinら⁷⁾ が想定した2種の Ca 緩衝系のうちの

Ca²⁺ 親和性の低い Ca 緩衝系のみが存在すると仮定した。さらに Forti ら³⁰⁾ はシミュレーションより導出される光応答波形を実波形に近似させる目的から, Ca 緩衝系の結合速度定数 (K_{on}) と解離速度定数 (K_{off}) をそれぞれ $0.2\text{sec}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ と 0.8sec^{-1} とするかなり緩徐な緩衝系を採用した。彼ら³¹⁾ の論文では言及されていないが, Ca²⁺ 充填実験により記録される jex を彼ら³¹⁾ のシミュレーションモデルより導出すると, 理論的 jex の時間経過は実測結果に比べて明らかに遅延する。それにもかかわらずシミュレーションモデルより導かれる種々の条件下での光応答波形は実波形にきわめて近似する³¹⁾。 K_{on} と K_{off} として緩徐な値を代入することは, 理論的光応答波形を実波形に近似させることに有効であるが, その反面 Ca²⁺ 充填実験における理論的 jex の時間経過を遅延させるという欠点を有すると推論される。以上述べた Hodgkin ら⁷⁾ のモデルおよび Forti ら³¹⁾ のモデルの長所を残し, 短所を消去するように本報においては最終的に緩徐 Ca 緩衝系 (「成績」のⅡ参照) を採用した。緩徐 Ca 緩衝系を構成する2種の Ca 緩衝系のうちの緩徐な Ca 緩衝系は低濃度でありながら Caf の小さい状態 (すなわち生理的条件下) においては Caf を調節する主要素となるのに対し, 2種の Ca 緩衝系のうちの速い Ca 緩衝系は高濃度であるが Caf の大きな状態 (すなわち Ca²⁺ 充填実験などの非生理的環境下) においてのみ Caf を調節する主要素となる。緩徐 Ca 緩衝系を構成する2種の Ca 緩衝系の濃度と解離定数の各値はサル杆体の Ca²⁺ 充填実験の実測結果より得られるが, 本報の実験方法からは得られなかった2種の Ca 緩衝系の解離速度定数を 20sec^{-1} と 5sec^{-1} と仮定することによって, Ca²⁺ 充填実験で記録される jex のみならず生理的条件下における光応答をも実測結果に近似させることが可能となる。

Caf が Cat の約10%であるという Cervetto ら³⁰⁾ の報告を受けて, Hodgkin ら⁷⁾ は上述の細胞内 Ca 緩衝系を想定したが, Ca 緩衝系の濃度が有限値である限り Caf/Cat 比がいかなる Cat 値においても常に一定であるということはない。Caf は Cat と細胞内 Ca 緩衝系の濃度と解離定数によって決定されるので, Ca²⁺ 充填実験の如き非生理的高濃度の Cat における Caf/Cat 比をそのまま暗時の生理的条件下の Caf に代入することによって, 暗時の Cat を推定することは誤りである。おそらく暗時の生理的条件下における Caf/Cat 比は, Ca²⁺ 充填実験の高濃度 Cat 条件下における Caf/Cat 比に比較してかなり低値であると推論される。この点からも Hodgkin ら⁷⁾ のモデルには改良の余地があると考えられる。

Ⅲ. Ca フィードバックの明順応への関与

「成績」のⅢで示す実験結果により, 両生類杆体と同様にサル杆体においても Ca フィードバックが光感度の調節に関与することが明らかになった。この結果を受けて Ca²⁺ がグアニル酸シクラーゼを抑制する Ca フィードバックによってのみ明順応現象が発現するシミュレーションモデルを構築し, このモデルによって暗時の生理的条件下における微弱フラッシュ光応答および背景光強度と光感度の関係 (S_F 対 I_s の関係) が再構築されることを示した (「成績」のⅣおよびⅦ参照)。このように明順応現象を調べた実測結果とシミュレーション結果が互いに近似することから, 間接的ではあるがサル杆体においても両生類杆体と同様に, Ca フィードバックが背景光強度に応じて光感度を調節する主要因子であると推定される。

光応答を記述するシミュレーションモデルを Forti ら³¹⁾ およ

び Sneyd ら³²⁾ はそれぞれ両生類の杆体と錐体において, 本報ではサル杆体において提唱した。Forti ら³¹⁾ は光照射により増大するホスホジエステラーゼ活性 [$\beta^*(t) \cdot I_s$] をロドプシン分子の光異性化ついで G 蛋白質の活性化の各過程から記述して導出したのに対して, 本報では無 Na-無 Ca 液灌流下で実測された微弱フラッシュ光応答より直接に抽出した点で, 本報のシミュレーションモデルはより簡素である。しかし本報ではサル杆体内の光情報変換機構および光感度調節機構を記述する式の中のさまざまな変数値に実測結果をそのまま代入し, シミュレーションモデルから実測結果に近似した光応答と明順応現象が得られるか否か検討することに主眼がおかれた。それゆえシミュレーションモデルを記述する式をできる限り簡素化し, 実験方法および実験結果の解析方法を工夫することによって未定の変数の個数を減じるように努めた。無 Na-無 Ca 液灌流下の微弱フラッシュ光応答の解析によって得られた $\beta^*(t)$ (「成績」のⅤ参照) と Forti ら³¹⁾ のシミュレーションモデルより導出される $\beta^*(t)$ を比較すると, Forti ら³¹⁾ が採用した $\beta^*(t)$ は本報の解析方法による $\beta^*(t)$ に比べ, 頂点に到る時間経過は速やかであるが, 暗時の定常値へ回復する時間経過がきわめて長い特徴を有する。図11下段の波形 b は急速 Ca 緩衝系の仮定より導出された理論的な微弱フラッシュ光応答であるが, 図11中段の滑らかな曲線で示された $\beta^*(t) \cdot I_s$ の代わりに Forti ら³¹⁾ のそれを本報のシミュレーションモデルに代入すれば, 図11下段の波形 b の回復過程にみられる律動性変化は消失するのであろう。しかし微弱フラッシュ光応答の律動性変化は, $\beta^*(t)$ を上記の如く変換させなくとも Ca 緩衝系の速度定数に小さい値を代入することによっても消失させることが可能である (「成績」のⅤ参照)。本報のシミュレーションモデルにおいては微弱フラッシュ光応答と矩形波光応答に律動性変化が表れないように, 前述の如く緩徐 Ca 緩衝系の K_{off1} と K_{off2} の値が設定された。これら K_{off} と「成績」のⅦで述べた C_0 の各値のみが本報のシミュレーションモデルにおける実測結果によらない変数値である。フラッシュ光応答の律動性変化は, 両生類杆体では殆ど観察されないが,

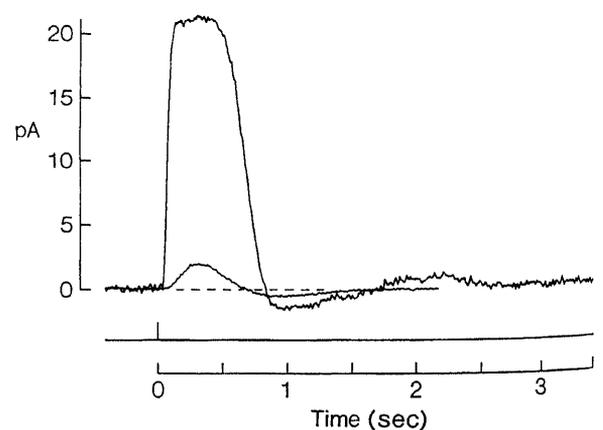


Fig. 14. Oscillations in the decline phase of flash responses recorded from a single rod of *M. fascicularis*. Dim and bright flashes delivered 2.6Rh* and 280Rh*, respectively, at time zero. The dim flash response and the bright flash response represent averages of thirty and two trials, respectively. Bandwidth was DC~40Hz. 38.0°C.

サル杆体では杆体を微小電極内に吸引・保持した直後のフラッシュ光応答にしばしば観察された。図14はカニクイザル杆体より記録されたフラッシュ光応答の律動性変化の一例を示す。微弱光のみならず光応答を飽和させる強い光を照射した際にも律動性変化が観察される。同様のフラッシュ光応答の律動性変化は22個のカニクイザル杆体のうちの13個で、9個のアカゲザル杆体のうちの3個で、6個のサバンナモンキー杆体のうちの1個で、また7個のガーネットガラゴ杆体のうちの2個で観察された。しかし杆体を微小電極内に吸引・保持し数分経過すると、フラッシュ光応答における律動性変化は消失した。こうした経時的な光応答波形における変化の一因として光応答中の Caf の変化が経時的に緩徐化する可能性が考えられる。杆体外節を微小電極内に吸引・保持すると、細胞膜上に存在する Na-Ca 交換機構が経時的に劣化して Ca^{2+} の細胞外への排出率が低下する可能性があるいは細胞内 Ca 緩衝系の速度定数が緩徐化する可能性が推測され、シミュレーションモデルにおいてたとえば(8)式あるいは(4)式の K_{ex} 値を変更するか、あるいは急速 Ca 緩衝系から緩徐 Ca 緩衝系へ変更することによってフラッシュ光応答の律動性変化が軽減または消失すると期待される。この傍証として Hodgkin ら⁹⁾ の報告がある。彼ら⁹⁾ は Ca^{2+} 充填実験により記録される交換電流の実験結果に基づいて、微小電極内に吸引・保持されたサンショウウオ杆体の Na-Ca 交換機構の活性が徐々に低下すると述べた。Schnapf ら³¹⁾ はカニクイザル錐体の光応答に大きな律動性変化が観察されると報告し、この大きな律動性変化に対するシミュレーションモデルを提出した。彼ら³¹⁾ はこのモデルにおいて、フラッシュ光応答中における Caf の変化の時定数 (τ_a) はホスホジエステラーゼ活性の変化の時定数 (τ_{PDE}) および cGMP 濃度の変化の時定数 (τ_{CG}) に比較してきわめて長いとした。たとえば、彼ら³¹⁾ の論文の表 2 の細胞 a では $\tau_{PDE}=13\text{msec}$ 、 $\tau_{CG}=20\text{msec}$ に対して $\tau_a=450\text{msec}$ が仮定された。 τ_a は j_{ex} の減衰の時定数にはほぼ同義であり、彼ら³¹⁾ が想定した 450msec はサル杆体における j_{ex} の減衰の時定数よりむしろ両生類杆体の j_{ex} の減衰の時定数⁽⁴⁵⁾⁾ に近似する。本報のシミュレーションモデルにより、光応答の律動性変化は光照射により増大するホスホジエステラーゼ活性の時間経過と光応答中の Caf の時間経過の2つの因子により増大すると推測され、さらにサル錐体の光応答における律動性変化が大きいのは細胞内 Ca 緩衝系と Na-Ca 交換機構の性質が杆体とあまり異なるのに、光照射により増大するホスホジエステラーゼ活性の時間経過とくにその回復過程が杆体に比べきわめて速いことによるのではないかと示唆される。Matthews ら⁶⁴⁾ はモルモット杆体内に Ca^{2+} キレートである 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) を注入することにより、フラッシュ光応答の遅延化と著しい律動性変化を観察し、哺乳類杆体においても Ca フィードバックが明順応に関与すると述べた。Forti ら³¹⁾ による両生類杆体内への BAPTA 注入後の光応答のシミュレーションと同様に、サル杆体の光情報変換機構を模した本報のシミュレーションモデルを用いて、1mM の細胞内 BAPTA 存在を仮定して導出された微弱フラッシュ光応答には両生類およびモルモット杆体における同様の光応答の遅延化、増大化および著しい律動性変化がみられた。

本報のシミュレーションモデルの特徴の一つはモデルで取り上げられた物質の細胞内濃度は外節内のいかなる部位において

も均一であると仮定したことである。Lamb ら²⁶⁾ は光異性化したロドプシン分子の効果は外節内において均一ではなく空間的に制限されていると報告した。しかし現在まで外節内における Ca^{2+} および cGMP の拡散に関する定量的報告がないので、本報では Forti ら³¹⁾ のモデルと同様に上記の仮定を採用した。この単純な仮定にもかかわらずシミュレーションによる光応答波形は実波形に類似した (Forti ら³¹⁾ の両生類杆体のシミュレーションモデルにおいても両者の波形はきわめて類似した)。特に Caf を Caf₀ (暗時の生理的条件下における Caf) に固定して Ca フィードバックを作用させない状態を仮定して、(4)式から導かれる f_s 対 I_s の関係が Lamb ら²⁶⁾ によって提唱された指数関数曲線に近似することから、光照射によって Ca^{2+} と cGMP が外節内で空間的にいかなる拡散経過を呈するか今後詳細に検討することが望まれる。

「成績」の VII で示された矩形波光応答のシミュレーションを行うに際して、1個の光異性化したロドプシン分子 (Rh*) により活性化されるホスホジエステラーゼ活性 [$\beta^*(t)$] は、矩形波光応答を飽和させる強度以下の光照射では明順応することなく一定であると仮定した。この仮定は、光照射により増大するホスホジエステラーゼ活性は光強度が全ロドプシン分子の 1/10000 が褪色する強度までは光強度に比例して一様に増大するという生化学的実験結果³⁸⁾ に基づいて設定された。全ロドプシン分子の 1/10000 が褪色する光強度はサル杆体の矩形波光応答が確実に飽和する $10000\text{Rh}^*\cdot\text{sec}^{-1}$ を越える光強度である。しかし Caf が一定に保たれた環境下においても杆体のフラッシュ光応答の時間経過は背景光照射によって短縮するという報告⁶⁵⁾ あるいは Caf によってホスホジエステラーゼ活性が変化し、ホスホジエステラーゼ活性に Caf を介する明順応がみられるという報告⁶⁶⁾ もあり、今後ホスホジエステラーゼ活性がフラッシュ光強度あるいは矩形波光強度に関連して変化する可能性を検討する必要がある。

両生類の杆体外節内には遊離 cGMP の約10倍量の cGMP が存在し^{34,40)}、外節内における cGMP の結合部位としてホスホジエステラーゼ分子内の cGMP 高親和性の cGMP 非分解部が報告された⁶⁸⁾ が、その結合および解離に関する定量的実験結果に乏しい。しかし全ての cGMP 感受性チャンネルを閉鎖させるに十分な強度の光照射によっても杆体内の全 cGMP 量は殆ど変化しない⁶⁹⁻⁷¹⁾ ことより、光照射により加水分解される遊離 cGMP 量は結合 cGMP 量に比べてごくわずかであり、また結合 cGMP 量は遊離 cGMP 濃度の変化に関わらずほぼ一定であると考えられるので、本報のシミュレーションモデルでは遊離 cGMP 濃度のみを考慮した。「成績」の IV に示す実験より得られた暗時の cGMP の分解速度定数 β_0 (約 1.2sec^{-1}) を、暗時の遊離 cGMP 濃度 (約 $8\mu\text{M}$; 「方法」の VI 参照) に代入することにより暗時の定常状態における cGMP の分解率として約 $10\mu\text{M}\cdot\text{sec}^{-1}$ が得られる。この値はウサギ網膜の生化学的実験により実測された約 $14\mu\text{M}\cdot\text{sec}^{-1}$ ⁷²⁾ に近似する。また 1個の Rh* により活性化されるホスホジエステラーゼ活性

[$\int \beta^*(t)dt$] が約 $0.033\text{Rh}^*\cdot\text{sec}^{-1}$ (「成績」の V 参照) であったことより、1個の Rh* によって約 $0.3\mu\text{M}$ の cGMP が加水分解されると試算される。すなわちサル杆体の外節内容積を $30\mu\text{m}^3$ (「成績」の II 参照) とすると、1個の Rh* によって約 5000個の cGMP 分子が加水分解されると試算される。この値もウサギ網膜の生化学的実験より得られた約 $10^4\text{cGMP}\cdot\text{Rh}^*\cdot\text{sec}^{-1}$ の

cGMP の加水分解率²⁰⁾に近似する。

これまで実験の困難さ故に殆ど解明されていなかった霊長類の杆体における光情報変換機構の諸性質が、本報の電気生理学の実験によって定性的にもまた定量的にも明らかになった。またこれらの実験結果を Ca フィードバックによってのみ明順応現象が発現するとして本報のシミュレーションモデルに代入して導出されたシミュレーション結果が、サル杆体の実測結果に近似したので、本報のシミュレーションモデルにおいてなされた設定がほぼ妥当であったと考えられる。したがってサル杆体においても両生類杆体と同様に Ca フィードバックが明順応の主要な機構であることが判明した。さらに本報で用いた4種のサル杆体で観察された明順応現象が、より下等な哺乳類の杆体のそれ^{21,22)}に定性的にも定量的にもきわめて近似することから、哺乳類の杆体は明順応の主要機構として互いに類似した Ca フィードバック機構を有すると推測される。また感覚の順応を記述するのに汎用されるウェーバー・フェヒナーの関係が、本報のシミュレーション結果によって杆体においては Ca フィードバックによっておおむね説明できることが判明した。他の感覚細胞においても同様の Ca フィードバックによる順応現象の発現の可能性が示唆される。

結 論

カニクイザル、アカゲザル、サバンナモンキーおよび夜行性のガーネットガラゴの4種のサルの杆体における明順応現象を検討した。さらに単離されたカニクイザルとアカゲザルの杆体における Na-Ca 交換機構と Ca フィードバック (Ca²⁺によるグアニル酸シクラーゼ活性の抑制) による光感度調節の有無についても検討し、以下の結果を得た。

1. 4種のサル杆体の矩形波光照射による光応答において、応答振幅が一過性の頂点を形成した後に低振幅の平坦部へ漸減する現象が観察された。矩形波光応答の平坦部の振幅 (f_s) と矩形波光強度 (I_s) の関係は、明順応の欠如を示す指数関数曲線より偏位し、より緩やかな f_s 対 I_s の関係を示した。矩形波光応答の平坦部における f_s 対 I_s の関係は4種のサル杆体においてほぼ同程度に指数関数曲線より偏位した。また4種のサル杆体の矩形波光応答は、約 100~400Rh*·sec⁻¹ の光照射によってその平坦部振幅は飽和振幅の半分となり、約 2000~4000Rh*·sec⁻¹ の光照射によって飽和した。

2. 背景光下の増分フラッシュ光に対する感度 (S_F) と背景光強度の関係は、 S_F が暗時のフラッシュ光に対する感度 (S_D) の約 1/25ないし約 1/100に低下するまでは明順応の欠如を示す指数関数曲線よりむしろウェーバー・フェヒナーの関係に近似した。さらに強い背景光下では、背景光に対する光応答振幅は飽和値に近づき S_F を求めることが困難となった。 S_F/S_D を 1/2にする背景光強度 (I_0) の平均値は4種のサル杆体間で近似し、30~50Rh*·sec⁻¹ であった。

3. 暗時にサル杆体内に Ca²⁺ を充填した後に強刺激光を照射することによって全ての cGMP 感受性チャネルを閉鎖させると、Na-Ca 交換機構の活性による内向きの交換電流が観察された。実測された交換電流の飽和値は約 5pA であり、複数の指数関数成分の和の時間経過をたどって減衰した。

4. 上記3の結果よりサル杆体外節内には複数種の Ca 緩衝系が存在すると推論され、細胞内 Ca 緩衝系が2種類であると仮定することにより、シミュレーションモデルより導出される

交換電流の理論的時間経過を実測結果のそれに合致させることができた。

5. 単離されたサル杆体の内節部を微小電極内に吸引し保持した状態で外節周囲を流れる灌流液から Na⁺ と Ca²⁺ を除いて、細胞内 Ca²⁺ 濃度を固定し Ca フィードバックを抑えると、弱刺激光に対するフラッシュ光応答の振幅は 2~3 倍に増大し、その頂点潜時は約 2 倍に延長し、サル杆体においても Ca フィードバックが明順応現象に関与することが示唆された。

6. 暗時に杆体外節周囲を流れる灌流液より Na⁺ を除くことによって生じる暗電流の減少の時間経過から求めた cGMP の暗時の代謝率 (β_0) は約 1.2sec⁻¹ であった。

7. 上記6と同様の実験において、無 Na⁺ 液の灌流中に観察された内向き膜電流の電荷量と、その後強矩形波光照射下に灌流液を無 Na⁺ 液からロック液に再置換させた際に観察された交換電流の電荷量の比較検討から、暗時のロック液灌流中における Ca²⁺ 流入による膜電流は cGMP 感受性チャネルを通して流れる暗電流の約 10% であると推定された。

8. 上記5で観察された微弱フラッシュ光応答の解析によって、微弱フラッシュ光により増大するホスホジエステラーゼ活性の時間経過 [$\beta^*(t) \cdot I_s$] が導出された。さらに $\beta^*(t) \cdot I_s$ を3段階のコンボリューション関数で近似させ、これを Ca フィードバックによってのみ明順応現象が発現するとして本報のシミュレーションモデルに代入すると、暗時の Ca フィードバックの働かない条件下での微弱フラッシュ光応答と生理的条件下での微弱フラッシュ光応答を再構築することができた。また1個のロドプシン分子の光異性化によって増大する cGMP 分解定数 [$\beta^*(t)$] の頂点振幅の平均値は約 0.09sec⁻¹·Rh*⁻¹ であり、 $\int \beta^*(t) dt$ の平均値は約 0.033Rh*⁻¹ であった。この結果よりサル杆体において1個のロドプシン分子の光異性化によって約 0.3μM の cGMP、すなわち約 5000個の cGMP 分子が加水分解されると試算された。

9. 個々の光異性化したロドプシン分子により活性化されるホスホジエステラーゼ活性は相互に干渉することなく、また細胞内 Ca²⁺ 濃度によっても左右されないと仮定し、上記8で得られた $\beta^*(t)$ を用いて矩形波光応答のシミュレーションを行い、矩形波光応答平坦部の振幅と光強度の関係 (f_s 対 I_s の関係) を導出した。さらにこのシミュレーション結果より増分フラッシュ光感度と背景光強度の関係 (S_F 対 I_0 の関係) を導出した。このシミュレーションによって理論的に得られた f_s 対 I_s の関係はそれぞれ上記の1および2の実測結果に近似したことから、本報のシミュレーションモデルがほぼ妥当な設定であると考えられる。すなわちサル杆体においても Ca フィードバックが明順応の主要な機構であると考えられる。また本報のシミュレーション結果によって、感覚の順応を記述するのに汎用されるウェーバー・フェヒナーの関係が、杆体においては Ca フィードバックによっておおむね説明できることが判明した。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始、御指導と御校閲を賜りました恩師河崎一夫教授に深く感謝の意を表します。また本研究の遂行にあたり、御指導と御協力を戴きました米国ジョンスホプキンス大学医学部の King-Wai Yau 教授と中谷敬医学博士に心より感謝致します。

文 献

- 1) Pugh, E. N. & Cobbs, W. H. : Visual transduction in

- vertebrate rods and cones. a tale of two transmitters, calcium and cyclic GMP. *Vision Res.*, **26**, 1613-1643 (1986).
- 2) Stryer, L.: Cyclic GMP cascade of vision. *Annu. Rev. Neurosci.*, **9**, 87-119 (1986).
 - 3) Yau, K. -W. & Baylor, D. A.: Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.*, **12**, 289-327 (1987).
 - 4) Nakatani, K. & Yau, K. -W.: Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment. *J. Physiol.*, **395**, 695-729 (1988).
 - 5) Yau, K. -W. & Nakatani, K.: Electrogenic Na-Ca exchange in retinal rod outer segment. *Nature*, **311**, 661-663 (1984).
 - 6) Schnetkamp, P. P. M.: Sodium-calcium exchange in the outer segments of bovine rod photoreceptors. *J. Physiol.*, **373**, 25-45 (1986).
 - 7) Hodgkin, A. L., McNaughton, P. A. & Nunn, B. J.: Measurement of sodium-calcium exchange in salamander rods. *J. Physiol.*, **391**, 347-370 (1987).
 - 8) Hodgkin, A. L. & Nunn, B. J.: The effects of ions on sodium-calcium exchange in salamander rods. *J. Physiol.*, **391**, 371-398 (1987).
 - 9) Lagnado, L., Cervetto, L. & McNaughton, P. A.: Ion transport by the Na: Ca exchange in isolated rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4548-4552 (1988).
 - 10) Yau, K. -W. & Nakatani, K.: Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment. *Nature*, **313**, 579-582 (1985).
 - 11) Gold, G. H.: Plasma membrane calcium fluxes in intact rods are inconsistent with the calcium hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1150-1154 (1986).
 - 12) McNaughton, P. A., Cervetto, L. & Nunn, B. J.: Measurement of intracellular free calcium concentration in salamander rods. *Nature*, **322**, 261-263 (1986).
 - 13) Miller, D. L. & Korenbrot, J. I.: Kinetics of light-dependent Ca fluxes across the plasma membrane of rod outer segments. A dynamic model of the regeneration of cytoplasmic Ca concentration. *J. Gen. Physiol.*, **90**, 397-426 (1987).
 - 14) Ratto, G. M., Payne, R., Owen, W. G. & Tsien, R. Y.: The concentration cytosolic free calcium in vertebrate rod outer segments measured with Fura-2. *J. Neurosci.*, **8**, 3240-3246 (1988).
 - 15) Lolley, R. N. & Racz, E.: Calcium modulation of cyclic GMP synthesis in rat visual cells. *Vision Res.*, **22**, 1481-1486 (1982).
 - 16) Pepe, I. M., Panfoli, I. & Cugnoli, C.: Guanylate cyclase in rod outer segments of the toad retina. *FEBS Lett.*, **203**, 73-76 (1986).
 - 17) Hodgkin, A. L. & Nunn, B. J.: Control of light-sensitive current in salamander rods. *J. Physiol.*, **403**, 439-472 (1988).
 - 18) Koch, K. -W. & Stryer, L.: Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. *Nature*, **334**, 64-66 (1988).
 - 19) Kawamura, S. & Murakami, M.: Regulation of cGMP levels by guanylate cyclase in truncated frog rod outer segments. *J. Gen. Physiol.*, **94**, 649-668 (1989).
 - 20) Baylor, D. A., Nunn, B. J. & Schnapf, J. L.: The photocurrent, noise and spectral sensitivity of rods of the monkey *Macaca fascicularis*. *J. Physiol.*, **357**, 575-607 (1984).
 - 21) Tamura, T., Nakatani, K. & Yau, K. -W.: Light adaptation in cat retinal rods. *Science*, **245**, 755-758 (1989).
 - 22) Nakatani, K., Tamura, T. & Yau, K. -W.: Light adaptation in retinal rods of the rabbit and two other non-primate mammals. *J. Gen. Physiol.*, **97**, 413-435 (1991).
 - 23) Baylor, D. A., Lamb, T. D. & Yau, K. -W.: The membrane current of single rod outer segments. *J. Physiol.*, **288**, 589-611 (1979).
 - 24) Yau, K. -W., Lamb, T. D. & Baylor, D. A.: Light-induced fluctuations in membrane current of single toad rod outer segments. *Nature*, **269**, 78-80 (1977).
 - 25) Lamb, T. D., McNaughton, P. A. & Yau, K. -W.: Spatial spread of activation and background desensitization in toad rod outer segments. *J. Physiol.*, **319**, 463-486 (1981).
 - 26) Hodgkin, A. L., McNaughton, P. A., Nunn, B. J. & Yau, K. -W.: Effect of ions on retinal rods from *Bufo marinus*. *J. Physiol.*, **350**, 649-680 (1984).
 - 27) Harosi, F. I.: Absorption spectra and linear dichroism of some amphibian photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, **66**, 357-382 (1975).
 - 28) Dartnall, H. J. A.: Photosensitivity. *In* H. J. A. Dartnall (ed.), *Photochemistry of Vision*, p122-145, Springer Verlag, New York, 1972.
 - 29) Baylor, D. A., Lamb, T. D. & Yau, K. -W.: Responses of retinal rods to single photons. *J. Physiol.*, **288**, 613-634 (1979).
 - 30) Hodgkin, A. L.: Modulation of ionic currents in vertebrate photoreceptors. *Proc. Retina Res. Foundation Symp.*, **1**, 6-30 (1988).
 - 31) Forti, S., Menini, A., Rispoli, G. & Torre, V.: Kinetics of phototransduction in retinal rods of the newt *Triturus cristatus*. *J. Physiol.*, **419**, 265-295 (1989).
 - 32) Sneyd, J. & Tranchina, D.: Phototransduction in cones: an inverse problem in enzyme kinetics. *Bull. Math. Biol.*, **51**, 749-784 (1989).
 - 33) Schnapf, J. L., Nunn, B. J., Meister, M. & Baylor, D. A.: Visual transduction in cones of the monkey *Macaca fascicularis*. *J. Physiol.*, **427**, 681-713 (1990).
 - 34) Nakatani, K. & Yau, K. -W.: Guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate-activated conductance studied in a truncated rod outer segment of the toad. *J. Physiol.*, **395**, 731-753 (1988).
 - 35) Cervetto, L., Lagnado, L. & McNaughton, P. A.: Activation of the Na: Ca exchange in salamander rods by intracellular Ca. *J. Physiol.*, **382**, 135p (1987).
 - 36) Yau, K. -W. & Nakatani, K.: Cation selectivity of light-sensitive conductance in retinal rods. *Nature*, **309**,

352-354 (1984).

- 37) **Hodgkin, A. L., McNaughton, P. A. & Nunn, B. J.:** The ionic selectivity and calcium dependence of the light-sensitive pathway in toad rods. *J. Physiol.*, **358**, 447-468 (1985).
- 38) **Barkdoll, A. E., Pugh, E. N. & Sitaramayya, A.:** Calcium dependence of the activation and inactivation kinetics of the light-activated phosphodiesterase of retinal rods. *J. Gen. Physiol.*, **93**, 1091-1108 (1989).
- 39) **Lühring, H. & Kaupp, U. B.:** Study of the mammalian cGMP-gated channels in excised membrane patches. *Biophys. J.*, **55**, 377a (1989).
- 40) **Yau, K. -W. & Nakatani, K.:** Light-suppressible, cGMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncate rod outer segment. *Nature*, **317**, 252-255 (1985).
- 41) **Korenbrot, J. I. & Miller, D. L.:** Cytoplasmic free calcium concentration in dark-adapted retinal rod outer segments. *Vision Res.*, **29**, 939-948 (1989).
- 42) **Rispoli, G., Fineberg, A. T. & Detwiler, P. B.:** Null current measurements provide estimate of intracellular Ca in ROS. *Biophys. J.*, **57**, 368a (1990).
- 43) **Baylor, D. A. & Hodgkin, A. L.:** Detection and resolution of visual stimuli by turtle photoreceptors. *J. Physiol.*, **234**, 163-198 (1973).
- 44) **Matthews, H. R., Murphy, R. L. W., Fain, G. L. & Lamb, T. D.:** Photoreceptor light adaptation is mediated by cytoplasmic calcium concentration. *Nature*, **334**, 67-69 (1988).
- 45) **Nakatani, K. & Yau, K. -W.:** Calcium and light adaptation in retinal rods and cones. *Nature*, **334**, 69-71 (1988).
- 46) **Fain, G. L., Lamb, T. D., Matthews, H. R. & Murphy, R. L. W.:** Cytoplasmic calcium as the messenger for light adaptation in salamander rods. *J. Physiol.*, **416**, 215-243 (1989).
- 47) **Nakatani, K. & Yau, K. -W.:** Sodium-dependent calcium extrusion and sensitivity regulation in retinal cones of the salamander. *J. Physiol.*, **409**, 525-548 (1989).
- 48) **Savitzky, A. & Golay, M. J. E.:** Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.*, **36**, 1627-1639 (1964).
- 49) **Baylor, D. A., Hodgkin, A. L. & Lamb, T. D.:** The electrical response of turtle cones to flashes and steps of light. *J. Physiol.*, **242**, 685-727 (1974).
- 50) **Cervetto, L., Lagnado, L., Perry, R. J., Robinson, D. W. & McNaughton, P. A.:** Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature*, **337**, 740-743 (1989).
- 51) **Daw, N. W. & Pearlman, A. L.:** Cat colour vision: one cone process or several? *J. Physiol.*, **201**, 745-764 (1969).
- 52) **Enroth-Cugell, C., Hertz, B. G. & Lennie, P.:** Cone signals in the cat's retina. *J. Physiol.*, **269**, 273-296 (1977).
- 53) **Barlow, H. B. & Levick, W. R.:** The Purkinje shift in the cat retina. *J. Physiol.*, **196**, 2-3p (1968).
- 54) **Hammond, P. & James, C. R.:** The Purkinje shift in cat: extent of the mesopic range. *J. Physiol.*, **216**, 99-109 (1971).
- 55) **Rodieck, R. W. & Rushton, W. A. H.:** Isolation of rod and cone contributions to cat ganglion cells by a method of light exchange. *J. Physiol.*, **254**, 759-773 (1976).
- 56) **Green, D. G.:** Light adaptation in the rat retina: evidence for two receptor mechanisms. *Science*, **174**, 598-600 (1971).
- 57) **LaVail, M. M.:** Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, **15**, 64-70 (1976).
- 58) **Wikler, K. C. & Rakic, P.:** Distribution of photoreceptor subtypes in the retina of diurnal and nocturnal primates. *J. Neurosci.*, **10**, 3390-3401 (1990).
- 59) **Aguilar, M. & Stiles, W. S.:** Saturation of the rod mechanism at high levels of stimulation. *Optica Acta*, **1**, 59-65 (1954).
- 60) **Fuortes, M. G. F., Gunkel, R. D. & Rushton, W. A. H.:** Incremental thresholds in a subject deficient in cone vision. *J. Physiol.*, **156**, 179-192 (1961).
- 61) **Copenhagen, D. R. & Green, D. G.:** The absence of spread of adaptation between rod photoreceptors in turtle retina. *J. Physiol.*, **369**, 161-181 (1985).
- 62) **Baylor, D. A., Matthews, G. & Yau, K. -W.:** Two components of electrical dark noise in toad retinal rod outer segments. *J. Physiol.*, **309**, 591-621 (1980).
- 63) **Kimura, J., Miyamae, S. & Noma, A.:** Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J. Physiol.*, **384**, 199-222 (1987).
- 64) **Matthews, H. R.:** Evidence implicating cytoplasmic calcium concentration as the messenger for light adaptation in rod photoreceptors isolated from the guinea-pig retina. *J. Physiol.*, **425**, 48p (1990).
- 65) **Nicol, G. D. & Bownds, M. D.:** Calcium regulates some, but not all, aspects of light adaptation in rod photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, **94**, 233-259 (1989).
- 66) **Kawamura, S. & Murakami, M.:** Calcium-dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods. *Nature*, **349**, 420-423 (1991).
- 67) **Yamazaki, A., Sen, I., Bitensky, M. W., Casnellie, J. E. & Greengard, P.:** Cyclic GMP-specific, high affinity, noncatalytic binding sites on light-phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, **255**, 11619-11624 (1980).
- 68) **Kilbride, P. & Ebrey, T. G.:** Light-initiated changes of cyclic guanosine monophosphate levels in the frog retina measured with quick-freezing techniques. *J. Gen. Physiol.*, **74**, 415-426 (1979).
- 69) **Goldberg, N. D., Ames III, A., Gander, J. E. & Walseth, T. F.:** Magnitude of increase in retinal cGMP metabolic flux determined by ¹⁴O incorporation into nucleotide α -phosphoryls corresponds with intensity of photic stimulation. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9213-9219 (1983).
- 70) **Blazynski, C. & Cohen, A. I.:** Rapid declines in cyclic GMP of rod outer segments of intact frog photorece-

ptors after illumination. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14142-14147 (1986).

71) Ames III, A., Walseth, T. F., Heyman, R. A., Barad, M., Graeff, R. M. & Goldberg, N. D.: Light-induced

increases in cGMP metabolic flux correspond with electrical responses of photoreceptors. *J. Biol. Chem.*, **261**, 13034-13042 (1986).

Light Adaptation and Sensitivity Regulation by Calcium Feedback in Primate Rods Toshihiro Tamura, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Jusen Med Soc.*, **101**, 479—503 (1992)

Key words primate rods, light adaptation, calcium feedback, Na-Ca exchanger, cGMP hydrolysis

Abstract

Light adaptation in amphibian rods is known to involve a Ca^{2+} -mediated negative feedback in the phototransduction process, which works mainly via an inhibitory modulation of the guanylate cyclase activity by Ca^{2+} . The macaque monkey rods, however, were reported to show negligible adaptation to light. This recent finding raises the possibility of a fundamental difference in phototransduction and sensitivity regulation between primate rods and amphibian rods. To examine this possibility in detail, adaptability to light was studied in retinal rods of 4 species of monkey. The current responses of monkey rods to light were recorded by drawing a single rod outer segment from a small piece of retina into a glass pipette. The current responses to a rectangular light step showed an initial transient peak followed by the rapid relaxation to a lower plateau level. The relation between light intensity and response amplitude at the steady plateau deviated significantly from an exponential curve expected in the absence of light adaptation. The incremental flash sensitivity on a background light of increasing intensity followed the Weber-Fechner relation. These results demonstrate light adaptation for monkey rods. The Na^+ -dependent Ca^{2+} efflux (exchange current) and calcium feedback, which might be involved in light sensitivity regulation, were studied. The exchange current recorded during illumination after having loaded the rod with Ca^{2+} in the dark measured up to 5 pA, and declined with a time course which appeared to have more than one exponential component. In the absence of calcium feedback, the current response of single rods to a dim flash was 2~3 times larger, and had a longer peak latency than in a physiological solution. With the hydrolytic rate for cGMP in darkness (1.2 sec^{-1}) and the incremental hydrolytic rate activated by one photoisomerization of rhodopsin, a quantitative simulation model of phototransduction was constructed, in which calcium feedback was hypothesized to be the only mechanism for light adaptation in rod outer segments. This model fitted well with the experimental results, which indicate that calcium feedback mainly regulates light sensitivity in primate rods.