

ネコ網膜水平細胞のグルタミン酸応答に関する研究

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/2297/9157

ネコ網膜水平細胞のグルタミン酸応答に関する研究

金沢大学医学部眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

佐々木 次 壽

若いネコより単離した網膜水平細胞の L-グルタミン酸に対する電流応答をパッチクランプ法を用いて研究した。水平細胞の形態学的特徴を持つ細胞を選択し使用した。調べた25個の水平細胞のすべてが膜電位を -46mV に保持した場合にグルタミン酸に対して内向きの電流応答を生じた。カイニン酸と α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate) はグルタミン酸を投与した場合に類似した作用を示した。100 μM の L-アスパラギン酸 (L-aspartate) および N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) も、灌流液にグリシンを加え Mg イオンを除去した場合にグルタミン酸投与に類似した作用を示した。100 μM の 2-アミノ-4-ホスホノ酪酸 (2-amino-4-phosphonobutyrate) および (1S, 3R)-1-アミノ-サイクロペンテン-1, 3-ジカルボキシル酸 [(1S, 3R)-1-amino-cyclopentane-1, 3-dicarboxylic acid] は電流応答を惹起しなかった。5 μM の 6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2, 3-ジオン (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione) はグルタミン酸の作用に拮抗した。よって水平細胞のグルタミン酸受容体は主に非-NMDA 型であるが NMDA 型も共存する。300 μM のグルタミン酸に対する脱感作は OFF 型双極細胞では認められたが水平細胞では認められなかった。

Key words L-glutamate, horizontal cell, non-NMDA receptor, desensitization, retina

網膜に入射した光は視細胞によって電気信号に変換され、その情報は主として網膜を縦方向に双極細胞から神経節細胞へと伝達され、視神経のインパルスとして視覚中枢へと伝達される。水平細胞は双極細胞とともに網膜第2次ニューロンである。双極細胞にはその受容野に光を照射すると脱分極する ON 型双極細胞と過分極する OFF 型双極細胞がある^{1,2)}。水平細胞はその受容野に光を照射すると緩徐な過分極を示し、OFF 型双極細胞と同様に視細胞の光刺激に対する応答の極性と同一極性の応答を示す^{1,2)}。水平細胞は抑制性のニューロンで視細胞から双極細胞へのシナプス伝達を修飾すると考えられている³⁾。水平細胞は双極細胞とともに視細胞の軸索終末部でシナプスを形成する^{3,4)}。L-グルタミン酸は視細胞より放出される神経伝達物質として広く認識されている^{5,6)}。1種類の神経伝達物質でシナプス後細胞が異なる応答を示すのはシナプス後細胞の神経伝達物質に対する特性が異なるためであると考えられる。ON 型双極細胞のグルタミン酸受容体は 2-アミノ-4-ホスホノ酪酸 (2-amino-4-phosphonobutyrate, APB) であることが報告され⁷⁻¹⁰⁾、著者は前編¹¹⁾でネコ網膜 OFF 型双極細胞のグルタミン酸受容体が非-NMDA 型のみであることを明らかにした。網膜水平細胞におけるグルタミン酸受容体にはナマズでは N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 型と非-NMDA 型が混在することが報告されており^{12,13)}、非-NMDA 型のみ存在する動物種も報告されている¹⁴⁾。コイ網膜においてその光刺激に対する電位変化は水平細胞に比較して OFF 型双

極細胞ではより一過性の応答を示すことが報告されている¹⁵⁾。発達した視覚系を持つ動物種であるネコの網膜の OFF 型双極細胞と水平細胞のグルタミン酸応答を同じ条件下で測定した報告はない。本研究では視細胞より水平細胞への信号伝達と視細胞より OFF 型双極細胞への信号伝達との差異を解明することを目的として、単離した水平細胞でのグルタミン酸がもたらす応答をパッチクランプ法を用いて解析した。

材料および方法

1. ネコ網膜水平細胞標本の作製

体重 1.0~1.5kg の若いネコを用いた。以下の水平細胞標本の作製法は Kaneko ら¹⁶⁾の方法に準じた。網膜を色素上皮から剥がしやすくするために動物を約1時間暗順応した後にエーテル吸入によって麻酔し、頸椎を脱臼させ直ちに両眼を摘出した。眼球周囲の付着物を100% O₂ ガスを通気した Leibovitz の L-15 培地 (Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) で洗い流し除去した。摘出した眼球を赤道部で半切し、眼球後半部を100% O₂ ガスを通気した Leibovitz の L-15 培地に浸した。網膜を剝離し、この網膜片を実験に供した。網膜片を直ちに100% O₂ ガスを通気した28℃の Leibovitz の L-15 培地に 5~15 単位/ml のパバイン (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, USA) にパバインを活性化させるために 0.1mg/ml の L-システイン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を加えた酵素液に20~50分間浸漬した。

平成7年6月28日受付, 平成7年9月4日受理

Abbreviations: AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate; AP-7, DL-2-amino-7-phosphonohexanoic acid; APB, 2-amino-4-phosphonobutyrate; Asp, L-aspartate; BSA, bovine serum albumin; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; EGTA, 5-ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic

この間酵素液には100% O₂ ガスを通気した。浸漬する時間とパパインの濃度はパパインの活性に応じて調節した。ついで網膜片を3℃の0.1mg/mlのウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (片山化学, 大阪) を含む Hanks 液 [135mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 5mM HEPES, 10mM ブドウ糖, 1ppm フェノールレッド (関東科学, 東京), pH は 1N NaOH により 7.4 に調整] で3回洗浄し, 酵素液を除いた。つぎに試験管に入った網膜片を先端を丸くした内径約 1.5mm のパスツールピペットで静かに出し入れし, 細胞を単離した。底面にカバーガラスをはり付けたペトリディッシュ (Falcon, Oxnard, CA, USA) の内底面をコンカナバリン A (type A, Sigma Chemical Co.) で被覆し, そこに単離された細胞の浮遊液を散布した。単離された細胞をガラス面に接着させるため, 約1時間5℃の低温用培養器に静置した。水平細胞はその特徴的な形態 (長い樹状突起と比較的大きな細胞体) により容易に確認された。

II. 記録方法

実験に供するペトリディッシュを位相差倒立顕微鏡 Diaphoto TMD (日本光学, 東京) に設置し, 重力により持続的に 0.1mg/ml の BSA を含む Hanks 液で灌流した。細胞を測定に先立ち写真撮影した。前編¹⁾と同様の方法でホールセルコンフィギュレーション (whole-cell configuration) を得た¹⁾。ホー

ルセルコンフィギュレーションで膜電位固定し, 膜電流を記録した。膜電流記録に用いた微小ガラス電極の作製方法は前編¹⁾と同じであった。微小ガラス電極内の標準的な溶液の組成は 120mM CsCl, 0.5mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 5mM 5-エチレングリコール-ビス (β-アミノ-エチルエーテル) N, N, N', N'-四酢酸 [5-ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid, EGTA], 10mM HEPES, 2mM Na₂ATP (Sigma Chemical Co.), 0.1mM Na₃GTP (Sigma Chemical Co.), 1mM Na-cGMP (Sigma Chemical Co.) であり, 1N の CsOH でその pH が 7.2 になるように調整した。微小ガラス電極先端を Hanks 液に浸し, 上記の微小ガラス電極内液を詰めた場合に, その電極抵抗は 20MΩ であった。

微小ガラス電極は低雑音電流電圧変換器 CEZ-2100 (日本光電, 東京) に接続された。電圧に変換された信号はベッセルフィルター型ローパスフィルター FV-625A (NF サーキットデザインブロック, 横浜) を通った後マイクロコンピュータ PC-9801RX (日本電気, 東京) に取付けたアナログ-デジタル変換器 ADX-98 (カノーブス, 神戸) でデジタル信号に変換され, ハードディスク内に蓄えられた。フィルターのカットオフ周波数は信号をデジタル変換する際のサンプリング周波数に適合するように調節した。PC-9801RX とそれに取付けたデジタル-アナログ変換器 DAX-98 (カノーブス) で保持電圧を制御し

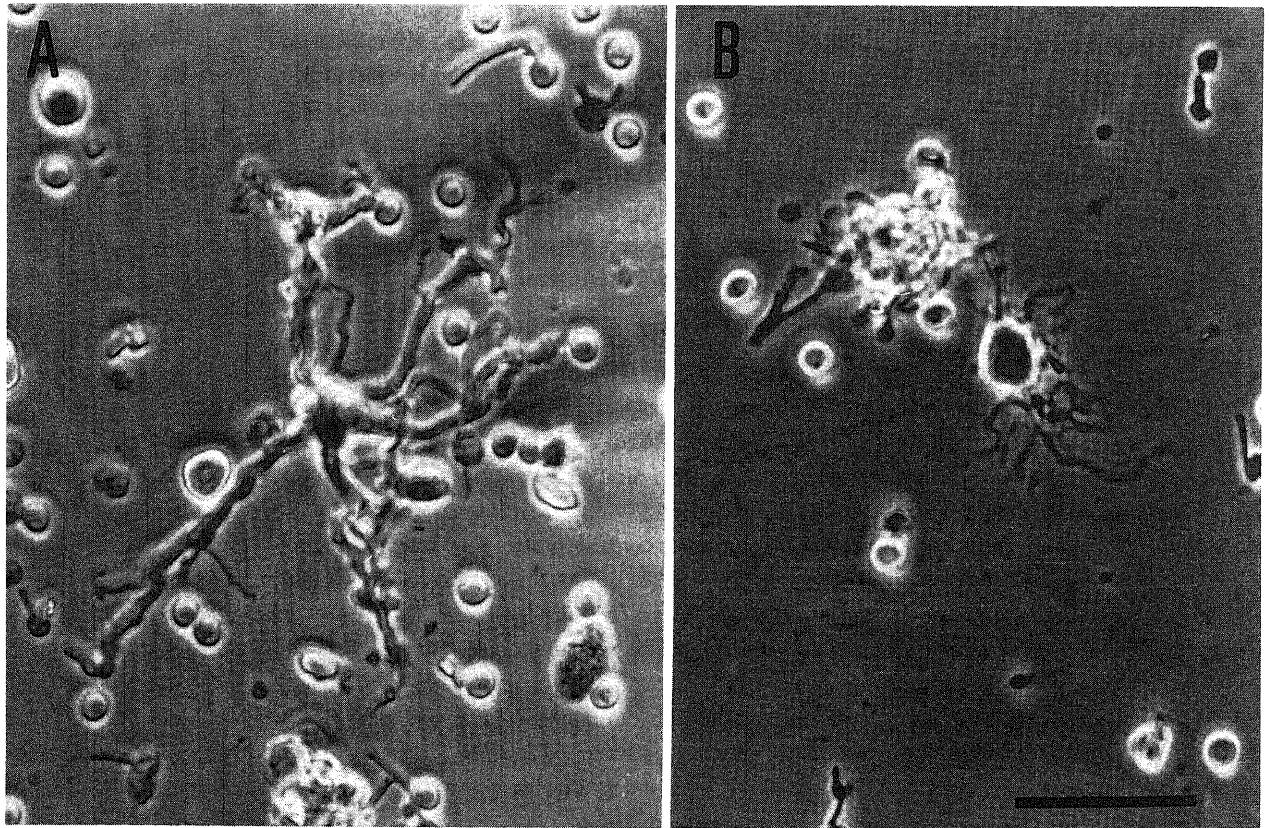


Fig. 1. Solitary horizontal cells dissociated from the cat retina. (A) A-type horizontal cell. (B) B-type horizontal cell. Scale bar, 50 μ m.

acid; NMDA, N-methyl-D-aspartate; 1S,3R, -ACPD, (1S,3R)-1-amino-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid; Vh, holding potential

た。データはワークステーション VAX3100 (Digital Equipment, Maynard, MA, USA) で処理された。不関電極としては 140mM NaCl, 1% 寒天を含む塩橋に接続した銀-塩化銀電極を用いた。微小ガラス電極と不関電極の液間電位は既に測定されており¹⁸⁾、本報では膜電位をそれによって補正して表示した。記録は室温 (19~22°C) で行なわれた。測定は細胞単離後 8 時間以内に終了した。

Ⅲ. 灌流並びに薬剤投与方法

L-グルタミン酸ナトリウム (片山化学) は電気泳動法や大径ピペットよりの圧投与および急速灌流法によって投与された。 α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate, AMPA) (Sigma Chemical Co.), カイニン酸 (Research

Biochemical Inc., Natick, MA, USA), NMDA (Sigma Chemical Co.), グリシン (和光純薬, 大阪), L-アスパラギン酸 (L-aspartate, Asp) (和光純薬), (1S,3R)-1-アミノ-サイクロペンテン-1,3-ジカルボキシル酸 {(1S,3R)-1-amino-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid, 1S,3R, -ACPD} (Tocris Neuramin, Bristol, UK), APB (Research Biochemical Inc.), 6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2,3-ジオン (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, CNQX) (Research Biochemical Inc.), および DL-2-アミノ-7-ホスホノヘプタン酸 (DL-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid, AP-7) (Research Biochemical Inc.) は急速灌流法で投与された。

電気泳動法, 灌流投与および圧投与の方法は前編¹¹⁾と同じであった。ただし脱感作の解析に用いた圧投与では水平細胞全体にグルタミン酸ナトリウム溶液が分布するように圧投与に用いたピペットの先端の内径を前編¹¹⁾に比して太くし (約 30 μ m), その先端を細胞より約 100 μ m 離れた。記録に用いた水平細胞数は 25 個であった。以下に示したデータは 3 個以上の細胞より得られた。

Ⅳ. 水平細胞の形態学的分類法

ネコ網膜には 2 種類の水平細胞が既に報告されており, 1 つは軸索を持たない A 型で, もう 1 つは短い軸索を持つ B 型である¹⁹⁾。A 型は長く太い樹状突起を持ち, 錐体に接続し, B 型は A 型に比して短く細い多くの樹状突起を持ち, 細胞体で錐体に接続し, 軸索末端で杆体に接続するとの報告^{5,20,21)}に従って本報では水平細胞を分類した。

成 績

Ⅰ. 水平細胞の形態学的特徴

A 型と B 型は上記の形態学的特徴より容易に区別できた (図 1)。本報では A 型が多く得られたことおよび今回単離した水平細胞の B 型には軸索が認められなかった (図 1 B), A 型を主たる研究対象にした。単離した水平細胞は 8 時間以上単離直後の形態を保っていたので, 実験は単離後 8 時間以内に終了した。

Ⅱ. グルタミン酸受容体のサブタイプ

ネコ網膜水平細胞においてどのようなグルタミン酸受容体のサブタイプが存在するかを調べた。グルタミン酸類似物質とその拮抗薬を -46mV に膜電位固定した水平細胞に灌流投与してその応答を調べた (n=6, 図 2)。カイニン酸 (20 μ M), AMPA (100 μ M), NMDA (100 μ M) および Asp (100 μ M) は -46mV に膜電位を固定した水平細胞に内向き電流応答を惹起した。Asp と NMDA を投与する際にはそれらの溶液に NMDA に対する応答を増強するグリシン (5 μ M) を加え, NMDA に対する応答を抑制する Mg イオンを除去した。100 μ M の APB, 1S,3R, -ACPD ではいずれも応答は生じなかった。Asp (100 μ M), NMDA (100 μ M) およびグリシン (5 μ M) を単独に投与した場合には応答は生じなかった。電流応答の大きさは AMPA (100 μ M) を投与した場合に大きく (114.0 \pm 71.0pA, n=4), NMDA (100 μ M) を投与した場合にはこれより小さい応答が得られた (13.8 \pm 5.8pA, n=4)。また NMDA 単独で投与した場合には応答が得られなかったことから, -46mV に膜電位固定した単離水平細胞に関してはグルタミン酸に対する応答は非-NMDA 型グルタミン酸受容体のみで惹起されると考えられた。

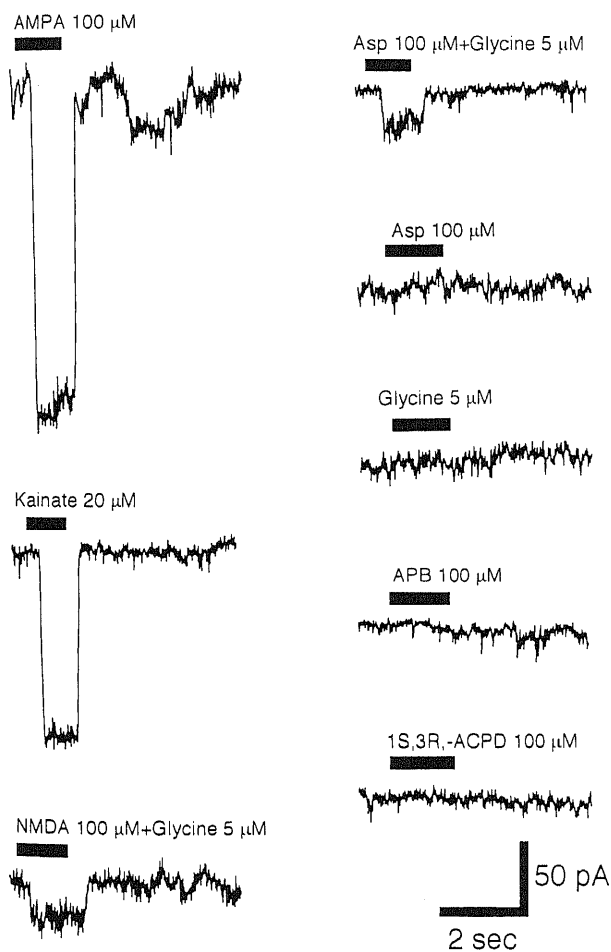


Fig. 2. Current responses to glutamate analogues from isolated horizontal cells. Glutamate analogues used: 100 μ M α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA), 20 μ M kainate, 100 μ M N-methyl-D-aspartate (NMDA) with 5 μ M glycine, 100 μ M L-aspartate (Asp) with 5 μ M glycine, 100 μ M Asp, 5 μ M glycine, 100 μ M 2-amino-4-phosphonobutyrate (APB), and 100 μ M (1S,3R)-1-amino-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S,3R, -ACPD). Each chemical was applied by bath application. When NMDA or Asp was applied, the extracellular solution contained no magnesium ion. Horizontal bars indicate timing of each chemical application. Holding potential, -46mV.

つぎに $5\mu\text{M}$ の CNQX を Hanks 液に添加し、それを灌流投与しながらグルタミン酸を電気泳動的に -46mV に膜電位を保持した水平細胞の各部位に投与した場合にはグルタミン酸による電流応答はどの部位に投与した場合でも完全に抑制された。このことから単離した水平細胞を -46mV に膜電位固定し、グルタミン酸を投与した場合の電流応答は非-NMDA 型グルタミン酸受容体によって惹起されると考えられた。

Ⅲ. 水平細胞のグルタミン酸に対する応答 (濃度-応答曲線)

水平細胞を -46mV に膜電位固定し、 $100\mu\text{M}$ のグルタミン酸ナトリウム溶液を圧投与した場合に測定したすべての水平細胞に内向き電流応答が発生した。これらの細胞に $1\sim 300\mu\text{M}$ のグルタミン酸ナトリウム溶液を灌流投与した。図 3 A に示すようにグルタミン酸濃度の増加に依存して内向き電流応答の振幅が増大し、最小有効濃度は $2\sim 3\mu\text{M}$ であった。 $100\mu\text{M}$ でその応答は飽和した。 $100\mu\text{M}$ のグルタミン酸によって惹起される電流の大きさを 1 とし、各濃度のグルタミン酸に対する応答の大きさを求めた (図 3 B)。グルタミン酸濃度が増加するに伴って振幅が増大したが、OFF 型双極細胞で見られたような脱感作は認められなかった。Hill 係数は 1.0 で K_d は $23\mu\text{M}$ であった。

Ⅳ. グルタミン酸に対する脱感作

水平細胞のグルタミン酸に対する脱感作を解析するために、 -46mV に膜電位固定した水平細胞に $300\mu\text{M}$ のグルタミン酸ナトリウムを圧投与してその電流応答を調べた ($n=4$)。比較のために水平細胞を単離した際に得られた OFF 型双極細胞にも同様の条件で $300\mu\text{M}$ のグルタミン酸ナトリウムを圧投与してその電流応答を調べた ($n=5$)。OFF 型双極細胞に投与した場合には、すべての細胞で投与直後に脱感作が認められた (図 4 上)。水平細胞の場合にはすべての細胞で脱感作は認められず、OFF 型双極細胞に比較して大きな振幅の応答が得られた (水平細胞では $177.5\pm 67.4\text{pA}$, $n=4$; OFF 型双極細胞では $65.4\pm 18.8\text{pA}$, $n=5$) (図 4 下)。電気泳動的にグルタミン酸を投与した場合には水平細胞では図 5 に示すように脱感作は認められなかった。

Ⅴ. グルタミン酸に対する感受性の分布

水平細胞の各部位のグルタミン酸に対する感受性を調べるために、 -46mV に膜電位固定した水平細胞の各部位にグルタミン酸を電気泳動法で投与し、その応答を調べた ($n=5$)。図 5 に示すようにグルタミン酸を細胞体付近に投与した場合には最も大きく急速な応答が得られた。グルタミン酸を投与した部位が

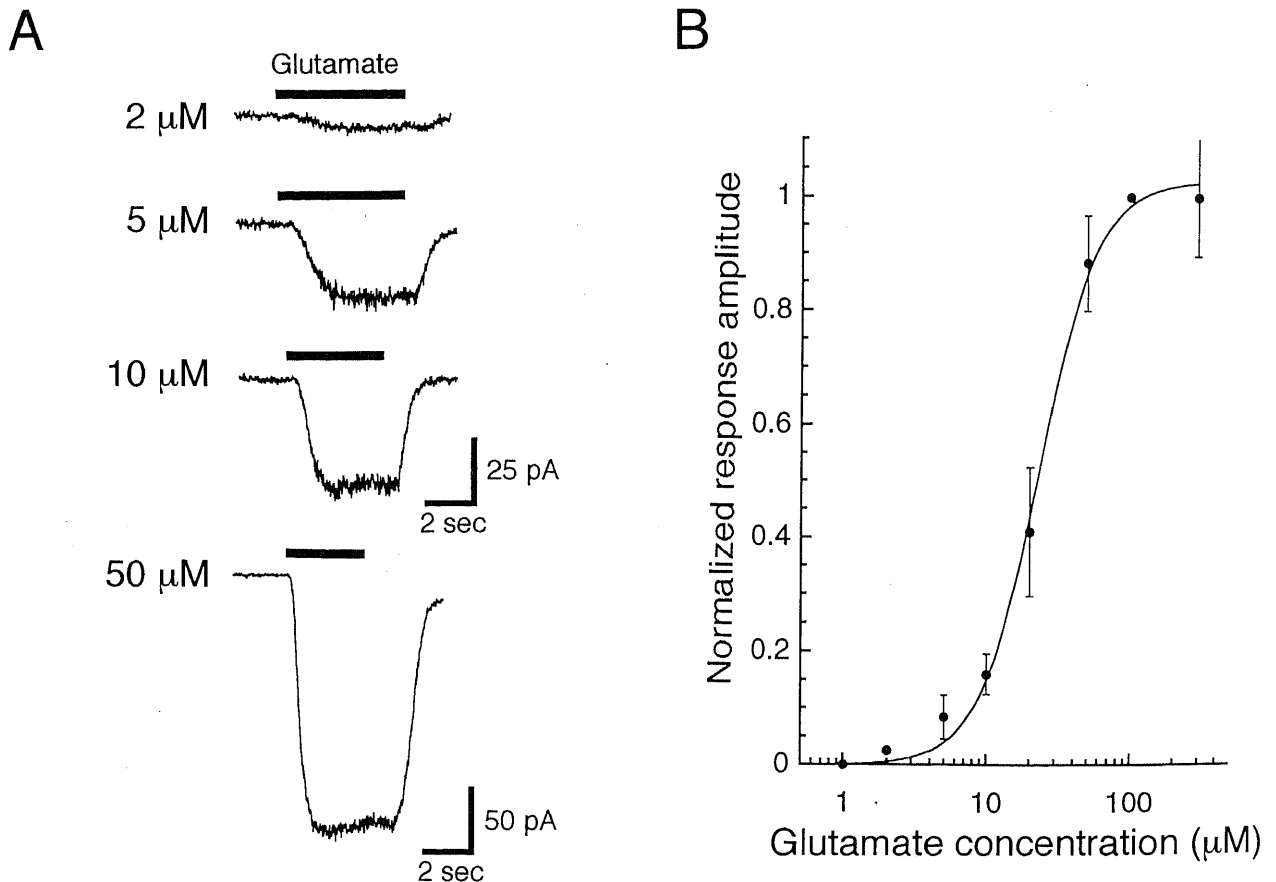


Fig. 3. Glutamate-induced current in isolated horizontal cells. (A) Currents induced in an isolated horizontal cell by various concentrations of glutamate ($2\sim 50\mu\text{M}$) applied by bath application. Holding potential, -46mV . The timing of glutamate application was indicated by horizontal bars. (B) Dose-response relationship of glutamate-induced current. The average (●) and standard deviation (short vertical bars) of the amplitude ratio at a membrane potential of -46mV were obtained from 3 cells. Data points were fitted by least square method to a Hill's equation with a coefficient of 1.0 and K_d of $23\mu\text{M}$.

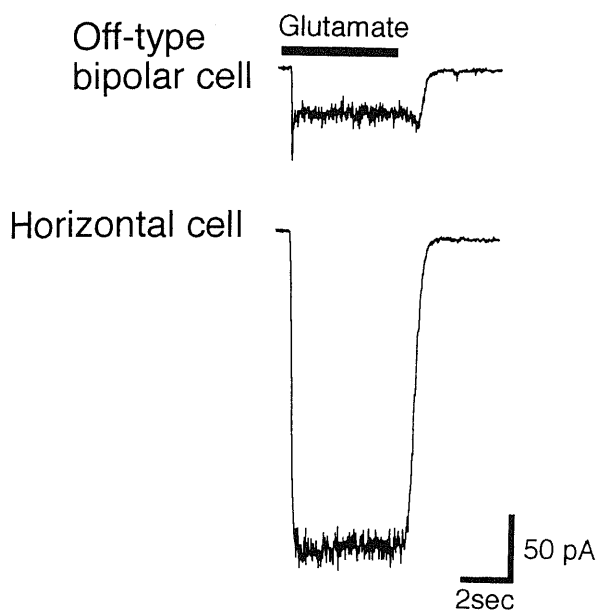


Fig. 4. Responses from an off-type bipolar cell and a horizontal cell to 300 μ M L-glutamate applied by pressure ejection. Note the existence of desensitization only in the off-type bipolar cell. The timing of glutamate application was indicated by a horizontal bar. Holding potential, -46 mV.

樹状突起に近づく程より小さく遅い応答が得られた。同様の結果はB型の水平細胞でも得られた。

VI. グルタミン酸による膜電流変化と膜電位の関係

以下ではグルタミン酸による膜電流の変化をグルタミン酸応答と略記する。グルタミン酸応答の逆転電位を求めるためにグルタミン酸応答と膜電位との関係を調べた。ネコ網膜水平細胞のグルタミン酸応答はその応答の大部分が非-NMDA型受容体による応答と考えられるので、膜電位を -76 mVから正の方向に段階的に変化させ 100μ Mのグルタミン酸ナトリウム溶液を水平細胞に圧投与してそのグルタミン酸応答を測定した。保持電位を変化させた場合に電位依存性のイオンチャネルによる電流が発生するために保持電位を変化させた後、膜電流が安定した後に 100μ Mのグルタミン酸ナトリウム溶液を水平細胞に圧投与してそのグルタミン酸応答を測定した。 -46 mVより脱分極方向に膜電位を保持した場合にはグルタミン酸応答は次第に減少し、 0 mV付近で応答が認められなくなり、より正の保持電位では外向き電流応答を示した。図6に示すように保持電位を -56 mVより深い膜電位に保持した場合にその傾きは減少し、電圧と電流の関係は弱い外向きの整流性を示した。逆転電位は -1.3 ± 1.5 mV ($n=4$)であった。灌流液からMgイオンを除去した場合でも同様の電圧-応答曲線が得られた。

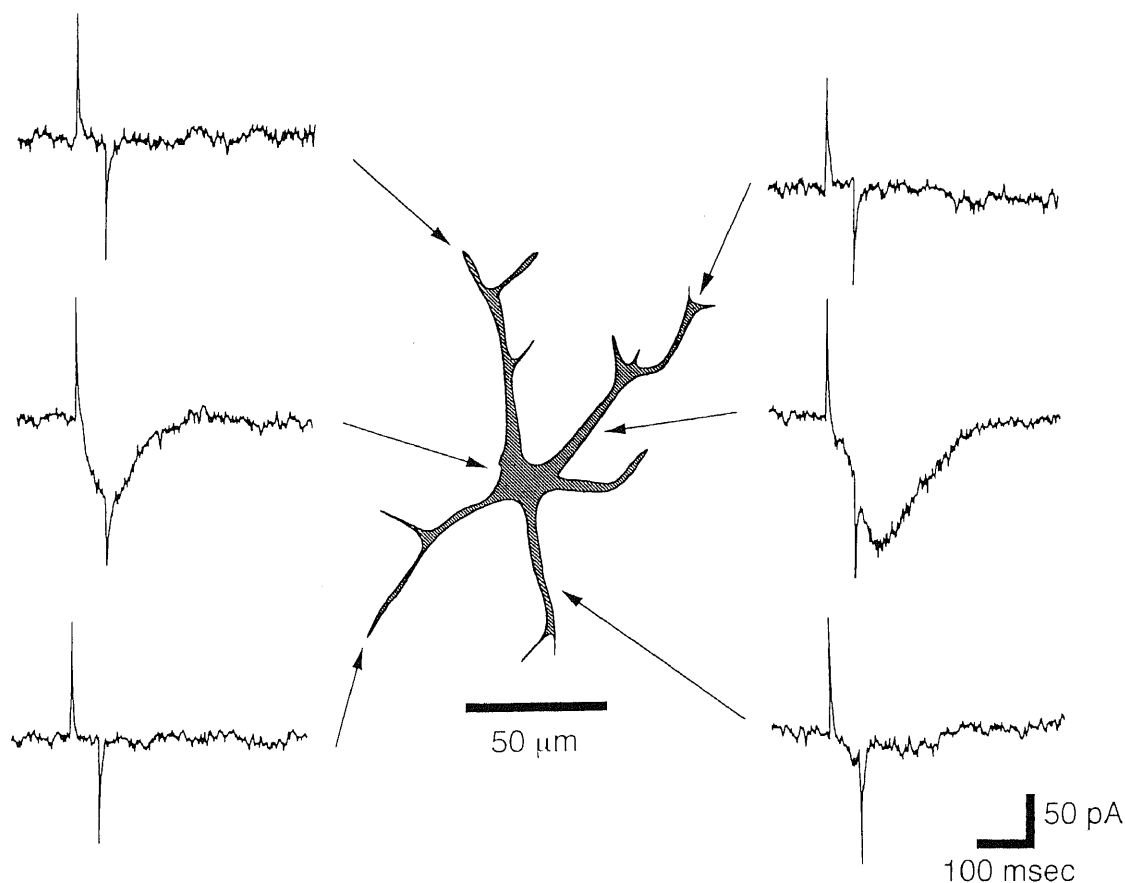


Fig. 5. Spatial distribution of sensitivity of an isolated horizontal cell to glutamate applied ionophoretically (-35 nA, 50 msec; brake current, 5 nA) at various regions of the cell. A pipette filled with 1 M L-glutamate was positioned within a few micrometers of the cell membrane under visual control. Holding potential, -46 mV. Pipette tip positions were indicated by arrows. Transients in responses are capacitive artifacts by ionophoresis.

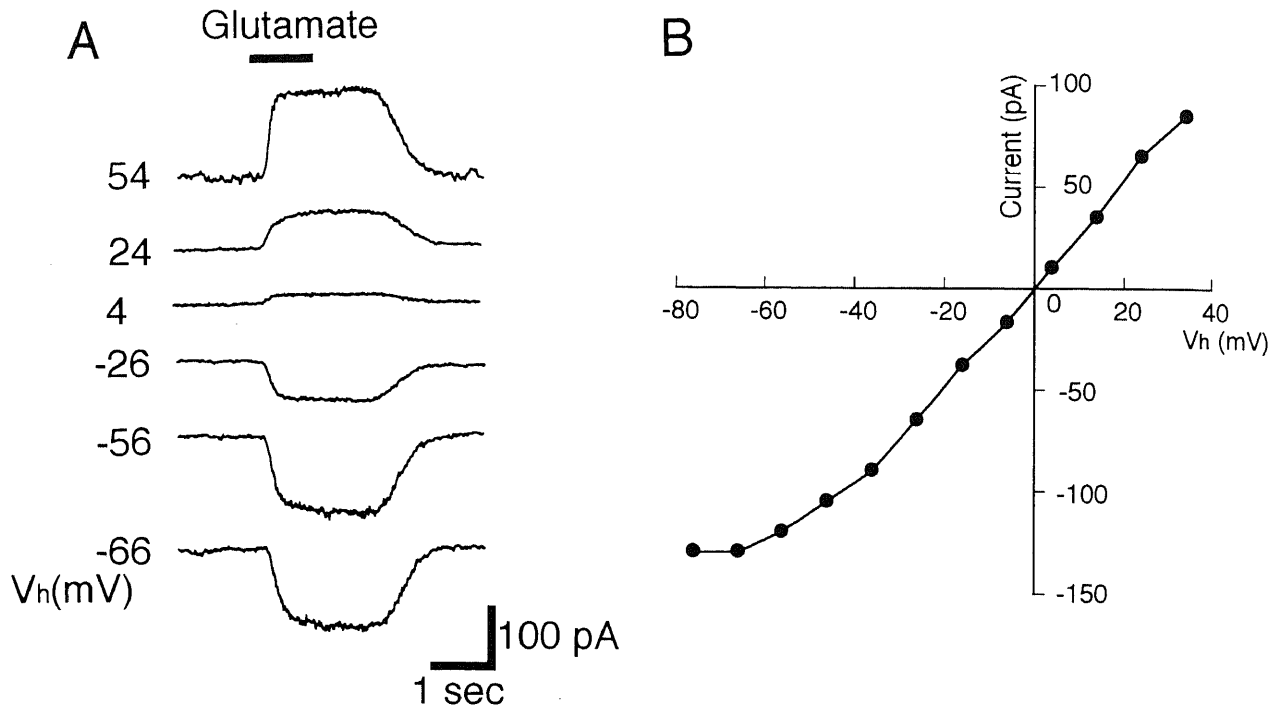


Fig. 6. Effects of holding potential (V_h) on glutamate-induced current. (A) Glutamate-induced current at different levels of the V_h . An isolated horizontal cell was superfused with Hanks' medium. Recording pipette was filled with a solution containing 120 mM CsCl mainly. Holding potential is indicated to the left of each trace which has been shifted vertically by an arbitrary amount for clarity. 100 μ M L-glutamate dissolved in Hanks' medium was applied by pressure ejection. The timing of glutamate application was indicated by a horizontal bar. (B) The relationship between the glutamate-induced current and the holding potential plotted from a different cell.

考 察

網膜にグルタミン酸を投与した場合に水平細胞に反応を惹起することはよく知られている^{22,23}。しかしその機序の解析は以下の理由により困難であった。すなわち網膜神経回路網による間接的な影響を除外しにくいこと、水平細胞同志がギャップジャンクションによって電気的かつ化学的に結合していること^{24,25}および網膜内のミュラー細胞や視細胞が投与したグルタミン酸を取り込むため^{26,27}に投与したグルタミン酸の一部しか水平細胞に到達しないことである²⁸。これらの影響を除外するために本研究では単離した水平細胞を用いてそのグルタミン酸受容体の性質を解析した。

単離操作後の2種類の水平細胞のうちB型の水平細胞に軸索が認められなかった(図1B)。その理由として、同時に単離した神経節細胞にも軸索や樹状突起がほとんど認められなかったことから単離操作によって機械的に軸索が切断されたことが考えられる。パパイン処理の時間を長くするかパパインの濃度を増加させた場合には単離された各細胞の形態はより多くの樹状突起を持つようになったにもかかわらず、軸索と軸索終末を持つB型水平細胞は得られず、しかも水平細胞のグルタミン酸応答の振幅はむしろ減少し、単離後早期に細胞が死滅した。このことから軸索と軸索終末を保った状態で測定に耐えるB型の水平細胞を単離するのは困難であると考えられる。

本研究において単離したA型のコネコ網膜水平細胞のグルタミン酸受容体のサブタイプにはNMDA型と非-NMDA型が混在した。ネココ水平細胞の静止膜電位は約 -55 mVであるこ

と²⁹、水平細胞同志がギャップジャンクションによって電気的かつ化学的に結合しているため^{24,25}に水平細胞の膜電位は極端には変化しにくいことおよびNMDA型の応答は深い電位では細胞外のMgイオンによって抑制されること³⁰から、水平細胞のグルタミン酸応答には非-NMDA型グルタミン酸受容体が関与していると考えられる。

本研究において水平細胞のペトリディッシュへの接着に用いたコンカナバリンAはグルタミン酸応答の脱感作を抑制することが知られており³¹⁻³⁴、水平細胞のグルタミン酸応答に脱感作が認められなかった(図4)。しかし同じ条件でコンカナバリンAで接着されたOFF型双極細胞では脱感作が認められた(図4)¹¹。また単離したキンギョやナマズ網膜水平細胞においてもグルタミン酸に対する脱感作は認められなかったことが報告されている^{13,14,35}。よって本研究でのコンカナバリンAが脱感作の有無の原因と考えにくい。コイ網膜においてその光刺激に対する電位変化は水平細胞に比してOFF型双極細胞ではより一過性の応答を示すことが報告されている¹⁵。このことはOFF型双極細胞と水平細胞での脱感作の有無に矛盾しない。また水平細胞の機能は広い受容野を持ち、信号の空間的積分を行ない視細胞に不帰還をかけることであり、水平細胞では双極細胞に比して高い時間分解能を必要とせず、OFF型双極細胞は錐体より入力を受け、高い時間分解能を必要とすることから、水平細胞に比してより一過性の応答を示すことは機能的により適合していると考えられる。

水平細胞のグルタミン酸応答の振幅は細胞体付近で大きく、樹状突起付近で小さかった(図5)。同様の結果はキンギョ網膜

水平細胞でも得られている³⁵⁾。このような結果が得られた理由として単離操作のために樹状突起先端のグルタミン酸受容体が失われ、シナプス外のグルタミン酸受容体が残る、電気泳動的にグルタミン酸を水平細胞の各部位に投与した場合にグルタミン酸を投与するガラス電極周囲の水平細胞の表面積が大きい細胞体付近では大きく早い応答が得られ、表面積が小さい樹状突起付近ではその応答は小さかったことが考えられる。

水平細胞のグルタミン酸応答の膜電位依存性はほぼ直線状の電圧-電流曲線を示した OFF 型双極細胞と異なり、深い電位で外向きの整流性を示した (図 6)。キンギョやナマズの網膜水平細胞でも J 字型の電圧-電流曲線を示すことが報告されており¹⁰⁾、これと類似した結果がネコでも得られた。共に非-NMDA 型グルタミン酸受容体を持つ OFF 型双極細胞と水平細胞の間で電圧-電流曲線が異なるのは、グルタミン酸が異常整流性 K⁺ チャネルに対して阻害作用を持つためであることが報告されている¹⁰⁾。

結 論

若いネコの網膜から単離した水平細胞の L-グルタミン酸に対する電流応答をパッチクランプ法を用いて検討し、哺乳類の網膜における視細胞から OFF 型双極細胞への信号伝達と視細胞から水平細胞への信号伝達の差異に関して以下の結果を得た。

1. 調べた25個の水平細胞すべてが膜電位を -46mV に保持した場合にグルタミン酸に対して内向きの電流応答を生じた。

2. カイニン酸と AMPA はグルタミン酸を投与した場合に類似した作用を示した。100 μ M の Asp および NMDA も、灌流液にグリシンを加え Mg イオンを除去した場合にグルタミン酸投与に類似した作用を示した。100 μ M の APB および 1S, 3R, -ACPD は電流応答を惹起しなかった。5 μ M の CNQX はグルタミン酸の作用に拮抗した。よって水平細胞のグルタミン酸受容体は主に非-NMDA 型で NMDA 型も共存する。

3. 水平細胞のグルタミン酸に対する応答はグルタミン酸の濃度に依存して増大し、100 μ M のグルタミン酸で応答は飽和した。

4. 300 μ M のグルタミン酸に対する脱感作は OFF 型双極細胞では認められたが、水平細胞では認められなかった。

謝 辞

稿を終えるに当り、御指導と御校閲をいただき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、御指導と御協力をいただきました慶応義塾大学医学部の金子章道教授に心より感謝します。

文 献

1) Kaneko, A.: Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. *J. Physiol.*, **207**, 623-633 (1970).
 2) Werblin, F. S. & Dowling, J. E.: Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *J. Neurophysiol.*, **32**, 339-355 (1969).
 3) Kolb, H.: The connections between horizontal cells and photoreceptors in the retina of the cat: electron microscopy of Golgi preparations. *J. Comp. Neurol.*, **155**, 1-14

(1974).

4) Kolb, H.: The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. *J. Neurocytol.*, **6**, 131-153 (1977).

5) Fisher, S. K. & Boycott, B. B.: Synaptic connexions made by horizontal cells within the outer plexiform layer of the retina of the cat and the rabbit. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **186**, 317-331 (1974).

6) Ayoub, G., Korenbrot, J. & Copenhagen, D. R.: Release of endogenous glutamate from isolated cone photoreceptors of the lizard. *Neurosci. Res. Suppl.*, **10**, S47-S55 (1989).

7) Copenhagen, D. R. & Jahr, C. E.: Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors. *Nature*, **341**, 536-539 (1989).

8) Nawy, S. & Jahr, C. E.: Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature*, **346**, 269-271 (1990).

9) Shiells, R. A. & Falk, G.: Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **242**, 91-94 (1990).

10) Villa, P., Kurahashi, T. & Kaneko, A.: L-glutamate-induced responses and cyclic GMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat. *J. Neurosci.*, **15**, 3571-3582 (1995).

11) 佐々木次壽: ネコ網膜 OFF 型双極細胞のグルタミン酸応答に関する研究. *十全医会誌*, **104**, 529-540 (1995).

12) O'Dell, T. J. & Christensen, B. N.: N-methyl-D-aspartate receptors coexist with kainate and quisqualate receptors on single isolated catfish horizontal cells. *Brain Res.*, **381**, 359-362 (1986).

13) Tachibana, M. & Okada, T.: Release of endogenous excitatory amino acids from on-type bipolar cells isolated from the goldfish retina. *J. Neurosci.*, **11**, 2199-2208 (1991).

14) Tachibana, M.: Permeability changes induced by L-glutamate in solitary retinal horizontal cells isolated from *Carassius auratus*. *J. Physiol.*, **358**, 153-167 (1985).

15) Kaneko, A. & Shimazaki, H.: Synaptic transmission from photoreceptors to bipolar and horizontal cells in the carp retina. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **40**, 537-546 (1976).

16) Kaneko, A., Pinto, L. H. & Tachibana, M.: Transient calcium current of retinal bipolar cells of the mouse. *J. Physiol.*, **410**, 613-629 (1989).

17) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, **391**, 85-100 (1981).

18) Kaneko, A. & Tachibana, M.: Effects of γ -Aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina. *J. Physiol.*, **373**, 443-461 (1986).

19) Cajal, S. R. y: The vertebrate retina. *In* R. W. Rodieck (eds.), *The Vertebrate Retina*, 1st ed., p773-904, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1973.

- 20) Boycott, B. B., Peichl, L. & Wässle, H.: Morphological types of horizontal cell in the retina of the domestic cat. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **203**, 229-245 (1978).
- 21) Wässle, H., Boycott, B. B. & Peichl, L.: Receptor contacts of horizontal cells in the retina of the domestic cat. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **203**, 247-267 (1978).
- 22) Cervetto, L. & MacNichol, E. F. Jr.: Inactivation of horizontal cells in turtle retina by glutamate and aspartate. *Science*, **178**, 767-768 (1972).
- 23) Murakami, M., Ohtsu, K. & Ohtsuka, T.: Effects of chemicals on receptors and horizontal cells in the retina. *J. Physiol.*, **227**, 899-913 (1972).
- 24) Kaneko, A.: Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina. *J. Physiol.*, **213**, 95-105 (1971).
- 25) Teranishi, T., Negishi, K. & Kato, S.: Regulatory effect of dopamine on spatial properties of horizontal cells in carp retina. *J. Neurosci.*, **4**, 1271-1280 (1984).
- 26) Schwartz, E. A. & Tachibana, M.: Electrophysiology of glutamate and sodium co-transport in a glial cell of the salamander retina. *J. Physiol.*, **426**, 43-80 (1990).
- 27) Tachibana, M. & Kaneko, A.: L-glutamate-induced depolarization in solitary photoreceptors: a process which may contribute to the interaction between photoreceptors in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5315-5319 (1988).
- 28) Ishida, A. T. & Fain, G. L.: D-aspartate potentiates the effects of L-glutamate on horizontal cells in goldfish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5890-5894 (1981).
- 29) Ueda, Y., Kaneko, A. & Kaneda, M.: Voltage-dependent ionic currents in solitary horizontal cells isolated from cat retina. *J. Neurophysiol.*, **68**, 1143-1150 (1992).
- 30) Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. & Prochiantz, A.: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, **307**, 462-465 (1984).
- 31) Stettmeier, H., Finger, W. & Dudel, J.: Effects of concanavalin A on glutamate operated postsynaptic channels in crayfish muscle. *Pflügers Arch.*, **387**, 20-24 (1983).
- 32) Mathers, D. A. & Usherwood, P. N. R.: Concanavalin A blocks desensitization of glutamate response on locust muscle fibers. *Nature*, **259**, 409-411 (1976).
- 33) Evans, M. L. & Usherwood, P. N. R.: The effects of lectins on desensitization of the locust muscle glutamate receptors. *Brain Res.*, **358**, 34-39 (1985).
- 34) O'Dell, T. J. & Christensen, B. N.: Horizontal cells isolated from catfish retina contain two types of excitatory amino acid receptors. *J. Neurophysiol.*, **61**, 1097-1109 (1989).
- 35) Ishida, A. T., Kaneko, A. & Tachibana, M.: Responses of solitary retinal horizontal cells from *Carassius auratus* to L-glutamate and related amino acid. *J. Physiol.*, **348**, 255-270 (1984).

L-glutamate-induced Responses in Horizontal Cells of the Cat Retina Tsugihisa Sasaki Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **104**, 541—548 (1995)

Key words L-glutamate, horizontal cell, non-NMDA receptor, desensitization, retina

Abstract

L-glutamate-induced current response was studied in isolated horizontal cells dissociated from the retina of young adult cats. Horizontal cells were identified by their morphological characteristics. Current responses were recorded from these cells by the patch clamp technique in the whole-cell configuration. Glutamate induced an inward current in horizontal cells ($n=25$) voltage-clamped at -46 mV. Kainate and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) worked as potent agonists. L-aspartate (Asp) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) (all at $100 \mu\text{M}$) also worked as potent agonists in the presence of glycine and Mg^{2+} -free solution. Neither 2-amino-4-phosphonobutyrate (APB) nor (1S,3R)-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S,3R,-ACPD) (all at $100 \mu\text{M}$) was effective. The glutamate-induced response was antagonized by $5 \mu\text{M}$ 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX). These results indicate that horizontal cells have both non-NMDA and NMDA receptors, the non-NMDA receptor being dominant. Desensitization to glutamate observed in off-type bipolar cells was not seen in horizontal cells.