

論文の内容の要旨

論文題目

「 初期視覚情報処理の神経機構
— 網膜におけるグルタミン酸作動性シナプス伝達の調節機構 — 」

氏名

細井 延武

すべての生物にとって、外界を認識してそれに反応するシステムは、適応して生きていくために必須の機構である。この機構は、神経系の情報処理によって実現されている。神経系は電気的シグナルを用いており、シナプスを形成して情報を伝達する。シナプスでは、情報の伝達に方向性があり、情報の送り手であるシナプス前細胞が興奮(脱分極)すると、細胞内に Ca^{2+} が流入してシナプス小胞が細胞膜に融合し、内容物である神経伝達物質が細胞外へ放出される(開口放出)。情報の受け手であるシナプス後細胞には、神経伝達物質の受容体が存在し、放出された伝達物質が受容体に結合すると応答が引き起こされ、情報が伝達される。シナプスでの情報伝達は、単なる情報の中継ではなく外的・内的な環境の変化に応じて伝達効率が変化する動的な性質を持っている。本研究では、視覚情報処理の初期過程を担っている網膜内でのシナプス伝達の調節機構について神経科学的手法をイモリ網膜に適用して実験的に検討した。

第1章では、脊椎動物網膜におけるシナプス伝達の性質と情報伝達経路について概観し、本研究の目的を明らかにした。網膜は5種類の神経細胞(視細胞・水平細胞・双極細胞・アマクリン細胞・神経節細胞)が整然と並んで層構造を形成している。網膜では、外界の視覚情報(光)が生体内電気信号に変換され、コントラストの増強など外界を認識するための最初の情報処理が行われる重要な役割を果たしている。網膜での主要な情報伝達経路としては、視細胞—双極細胞—

神経節細胞の経路があり、視細胞－双極細胞間と双極細胞－神経節細胞間の両方においてグルタミン酸作動性のシナプス伝達が行われている。グルタミン酸受容体には、大別して、イオンチャンネル型(非 NMDA 受容体と NMDA 受容体)と代謝型(グループ I、II、III)の 2 つがある。

網膜には光が点いたという ON 情報を担う経路(ON 経路)と光が消えたという OFF 情報を担う経路(OFF 経路)が存在し、視細胞－双極細胞間のシナプス伝達が行われる外網状層において ON 経路と OFF 経路が分離する。視細胞は伝達物質としてグルタミン酸を放出するが、ON 型双極細胞には代謝型グルタミン酸受容体が存在し、OFF 型双極細胞にはイオンチャンネル型受容体が存在するため、光に対する応答の極性が異なる。代謝型グルタミン酸受容体のサブタイプがクローニングされ、網膜におけるこれら受容体の分布が検討された結果、ON 型双極細胞の樹状突起にはグループ III 代謝型グルタミン酸受容体のサブタイプである mGluR6 が存在していることが明らかにされた。しかし、シナプスを形成している外網状層と内網状層には mGluR6 以外のグループ III 代謝型グルタミン酸受容体も広く分布していることが明らかになった。これまで、視細胞と ON 型双極細胞間のシナプス伝達を選択的に阻害すると考えられていた L-AP4 という薬物は、ON 型双極細胞の mGluR6 以外のグループ III 代謝型グルタミン酸受容体にも作用する可能性が高い。そこで、本研究では、mGluR6 以外のグループ III 代謝型グルタミン酸受容体が、グルタミン酸作動性シナプス伝達に対して果たしている機能とそのメカニズムを解明することを目的とした。実験にはイモリの網膜スライス標本を用い、各種の神経細胞から電氣的応答を記録して解析した。

第2章では、双極細胞－神経節細胞層(Ganglion Cell Layer)に存在する細胞(以下、神経節細胞と異所性アマクリン細胞をまとめて「GCL 細胞」と呼ぶ)間にグルタミン酸作動性シナプスが形成されている内網状層において、グループ III 代謝型グルタミン酸受容体が果たす機能について検討した。GCL 細胞を膜電位固定して光応答を記録した。網膜に存在するグループ III 代謝型グルタミン酸受容体を L-AP4 によって活性化させると、GCL 細胞の ON 応答が消失するだけでなく OFF 応答も減弱した。光情報の伝達において、グループ III 代謝型グルタミン酸受容体は ON 経路に対してのみならず、OFF 経路に対しても機能していることが明らかになった。しかし、グルタミン酸放出の引き金となる双極細胞の Ca^{2+} 電流は、ON 型双極細胞でも OFF 型双極細胞でも L-AP4 によって影響されなかった。また、ON 型あるいは OFF 型双極細胞と GCL 細胞から同時記録を行い、双極細胞を電気刺激して生じた GCL 細胞の興奮性シナプス後電流(EPSC)に関して解析を行ったが、L-AP4 はこの誘発性 EPSC に対して影響しなかった。したがって、内網状層におけるグルー

Ⅲ代謝型グルタミン酸受容体は双極細胞-GCL 細胞間のグルタミン酸作動性シナプス伝達には直接影響を及ぼしてはいないことが明らかになった。L-AP4 の投与によって GCL 細胞の OFF 応答が減弱したのは、L-AP4 が内網状層ではなく外網状層におけるシナプス伝達に影響を及ぼしたためであると考えられる。

第3章では、外網状層におけるグルタミン酸作動性シナプス伝達に対するグループⅢ代謝型グルタミン酸受容体の機能について検討した。網膜第2次ニューロンである OFF 型双極細胞や水平細胞を膜電位固定してそれぞれの光応答を記録し、L-AP4 の効果を調べた。OFF 型双極細胞においても水平細胞においても、暗時での定常的内向き電流や光刺激に対する OFF 応答は、L-AP4 によって抑制された。しかし、グルタミン酸を細胞外投与したときに生じる OFF 型双極細胞や水平細胞のグルタミン酸応答は L-AP4 によって影響を受けなかった。したがって、L-AP4 は、シナプス後細胞である双極細胞や水平細胞に対してではなく、シナプス前細胞である視細胞に存在するグループⅢ代謝型グルタミン酸受容体を活性化させてグルタミン酸の放出に対して抑制的に働くことが明らかになった。

第4章では、視細胞からのグルタミン酸放出がグループⅢ代謝型グルタミン酸受容体の活性化によって抑制される機構について検討した。視細胞には、明所視で働く錐体と暗所視で働く桿体がある。錐体では、細胞内への cGMP 依存性陽イオンチャンネルを介した Ca^{2+} 流入と L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入によって、グルタミン酸放出が引き起こされると報告されている。そこで、錐体を膜電位固定して L-AP4 を投与したところ、cGMP 依存性陽イオンチャンネルを介した光応答は変化しなかったが、L 型 Ca^{2+} 電流は活性化のキネティクスが遅くなると共に振幅が抑制された。 Ca^{2+} 電流-電圧関係は L-AP4 によって脱分極側に移動した。また、 Ca^{2+} 電流の抑制は G タンパク質の活性化を伴っていた。一方、桿体においては、グルタミン酸放出を引き起こす L 型 Ca^{2+} 電流に対して L-AP4 は何ら影響を及ぼさないことが明らかになった。視細胞(錐体あるいは桿体)とシナプス後細胞(OFF 型双極細胞あるいは水平細胞)からの同時記録を行い、視細胞を脱分極させて発生させた誘発性 EPSC を記録し、L-AP4 の効果を調べた。その結果、錐体からの誘発性 EPSC は抑制を受けたが、桿体からの誘発性 EPSC は変化しなかった。また、錐体と桿体の Ca^{2+} 電流は、いずれも薬理的に L 型と同定されたが、錐体の Ca^{2+} 電流は、桿体に比べて活性化のキネティクスが遅く、また、L-AP4 によってさらに活性化が遅くなることがわかった。

第5章では、錐体 Ca^{2+} 電流の活性化キネティクスを調節する機構について検討した。錐体の

Ca²⁺電流の活性化を遅くする機構としては、1)錐体に存在するグループⅢ代謝型グルタミン酸受容体の定常的な活性化による抑制、2)Ca²⁺電流の活性化によって開口放出が生じ、その際伝達物質とともにシナプス小胞から放出されたH⁺によってCa²⁺電流が抑制されるという、自己H⁺フィードバック抑制機構、が挙げられる。1)の機構については、グループⅢ代謝型グルタミン酸受容体がGタンパク質を活性化した後、Gタンパク質が直接Ca²⁺チャンネルに結合してCa²⁺電流を抑制する場合(Gタンパク質の直接効果)と、Gタンパク質が何らかのカスケードを介して細胞内のセカンドメッセンジャーの濃度を調節してCa²⁺電流を抑制する場合(Gタンパク質による間接的効果)が考えられる。Gタンパク質の直接効果の場合には、強い脱分極のプレパルスを与えると、Ca²⁺電流の促通(プレパルス促通)が生じることが知られている。そこで、錐体を膜電位固定し、Ca²⁺電流に対するプレパルスの効果を調べたところ、Ca²⁺電流はプレパルスによって促通され、見かけ上活性化が速くなった。しかし、2)の自己H⁺フィードバック抑制機構が働いている場合でも、プレパルスの時点で開口放出が生じてシナプス小胞が枯渇し、テストパルス時に開口放出が生じなくなれば自己H⁺フィードバックは働かず、Ca²⁺電流のプレパルス促通が生じうる。この可能性を確かめるために細胞外液のpH(H⁺濃度)緩衝能力を高めたところ、Ca²⁺電流のプレパルス促通は消失したが、L-AP4によるCa²⁺電流の抑制は残存した。つまり、錐体Ca²⁺電流のプレパルス促通は、Gタンパク質による直接効果ではなく、自己H⁺フィードバック抑制の解除によって生じていた。したがって、錐体のCa²⁺電流の活性化キネティクスは、グループⅢ代謝型グルタミン酸受容体の活性化を介する経路と、自己H⁺フィードバックを介する経路によってそれぞれ別個に制御されることが明らかになった。

第6章では、以上の一連の実験結果に基づいて総合的考察を行った。網膜にはグループⅢ代謝型グルタミン酸受容体のうちmGluR6がON型双極細胞の樹状突起に存在し、視細胞から放出されたグルタミン酸を受容してON情報を視覚中枢に伝達することが既に明らかにされている。本研究では、錐体に存在しているグループⅢ代謝型グルタミン酸受容体が活性化されると、Ca²⁺電流が抑制されて錐体からのグルタミン酸放出を抑制することを新たに見いだした。したがって、錐体のグループⅢ代謝型グルタミン酸受容体は、ON経路に対してもOFF経路に対しても情報伝達を調節する役割を持っていることがわかった。また、錐体と桿体のCa²⁺電流はいずれも薬理学的にL型に属しているにもかかわらず、錐体のCa²⁺電流のみがグループⅢ代謝型グルタミン酸受容体を介する制御と伝達物質(グルタミン酸)の開口放出に伴う自己H⁺フィードバックによる制御を

受けていることが明らかになった。したがって、錐体と桿体の Ca^{2+} チャンネルは分子レベルで異なっていることが推測された。桿体に比べて錐体においては伝達物質放出を制御する機構が複雑になっているのは、おそらく、錐体が働く明順応状態で微妙に時空間分解能などを最適化する必要があるからであろうと思われる。