

# 網膜ラボ

## ( Retinal Lab. )

研究項目：NOによる神経回路網制御の研究

研究期間：平成9年度～13年度

### 1. 研究の背景

ちょうど百年前に物理学が目覚ましい進歩を遂げた時と同じように、近年の神経科学の進歩は目ざましく、十年以内に重大なブレークスルーが起こりそうな気配である。そのキーポイントは、学習・記憶という脳の機能の基礎を担う神経の可塑性(入力信号の頻度・強弱に応じて変化する柔軟性)に関係したものである。可塑性の究明は、35億年の生物進化の産物である脳・神経系(神経回路網)の仕組みを解明するための鍵であると考えられている。また神経回路網での情報処理は、シナプスすなわち化学シナプスと電気シナプスでの信号処理に帰着する。発生学的に脳から分化して出来た神経回路網であり、視覚情報処理に関して重要な役割を持っているのが、網膜である。網膜や脳神経回路網のシナプスに対する「局所領域での制御方式」に関する解明は、従来型の1対1の入出力関係による方式と全く異なる原理に関するものであり、それらの新しい原理は、ジワジワとした「柔らかい制御」、 「新しいニューラルネット」の構築という新たな神経回路工学・情報工学への重要な示唆を与えらると思われる。この神経回路網の新しい制御方式の解明は、新しい原理を持った超並列の新しい情報処理機器、インテリジェントセンサー、脳型コンピューターの方式に関する設計原理を提供することが期待される。

我々は、網膜神経回路網の可塑性シナプスの生理的機能を解析し、シナプスの制御機構とその可塑性を担う分子に関する研究を行ってきた。一酸化窒素(NO)は、有毒なガスであるが、神経系を含む多くの生体器官で微量であるが生産されており、制御因子の一つと考えられ、従来から知られてきた伝達物質を経ずに、神経細胞間の直接情報伝達や逆行性情報伝達の働きをする。このNOによる神経制御の新しい制御方式と制御の分子メカニズムを解明することを目的に研究してきた。我々の実験において網膜では、シナプスの抵

抗を可塑的に、かつゆっくりとした効き方で制御しているという証拠を得た。これらのことは、研究の当初には全く予想出来なかったことであった。

### 2. 研究経過と研究成果

当グループは、生体機能応用産業技術研究開発制度において「神経回路網におけるシナプス可塑性の分子機構の研究」(H6-8年度)のテーマでシナプスの可塑性の研究を行ってきた。網膜神経回路網におけるシナプスの可塑性を担う分子として、ドーパミンが明順応効果と同様にギャップ結合チャネル(電気シナプスを構成するもの)を閉じることにより、網膜の水平細胞受容野を狭くすることから、Dowlingらの主張とは逆にドーパミンが明順応時に放出されていることを示唆した。このことは、ドーパミンが目の網膜における空間分解能を向上させる作用があり、明順応信号として機能していることを示した。また、明順応では、錐体視細胞入力を受ける水平細胞の一つであるH1型水平細胞の分光感度が尖っているが、暗順応網膜においてドーパミンが、H1型水平細胞の分光感度を尖らせ(色弁別能を上昇させることに相当)、明順応様の変化を引き起こすことを示した。

また、視細胞は暗時に伝達物質を放出しており、H1型水平細胞は、主として赤錐体視細胞から符号保存の入力を受けているが、明順応状態では、その分光感度が、短波長側で赤錐体視細胞のものよりかなり低いことから、赤錐体以外に短波長感受性錐体(青錐体と考えられる)由来で、順応依存の可塑性を持つ符号反転の錐体入力があり、この入力により明順応では、分光感度の青領域を著しく減少させ、分光感度を尖らせることにより、色弁別能を高めると考えた。そして、H1型水平細胞における入力抵抗の測定結果から短波長感受性錐体視細胞の入力シナプスは、伝達物質によりチャネルが閉じる符号反転で抵抗増大型、長波長感受

性錐体入力、伝達物質でチャンネルが開く従来型の興奮性の符号保存の抵抗減少型(すなわちEPSP型)と考えた。つまり、H1型水平細胞には、膜抵抗の刺激波長依存性があることを見出した。このことは、H1型水平細胞には、視細胞から放出される化学伝達物質グルタミン酸により開く従来型のタイプのチャンネル以外に閉じるタイプのチャンネルが存在することを示唆した。

### 2.1 NOは明順応信号

NOは、グアニル酸シクラーゼ(GC)の活性化によりcGMPの増大を促進することが知られている。NO供与剤(SNP=NaニトロプルシッドやSNOG=S-nitrosoglutathione)を灌流で投与することにより、生じるNOは、鯉の暗順応網膜におけるH1型水平細胞の光応答・分光感度特性に対して、明順応作用だけでなく分光特性や受容野の制御にも重要な役割を果たしていることを示した。そして、網膜神経細胞で視細胞-水平細胞間のシナプスが非常に可塑的であり、ドーパミンだけでなくNOもその可塑性に寄与していることを示した。抵抗増大型のチャンネルは、APB(グルタミン酸の類似物質、2-amino-4-phosphonobutyrate)に感受性があることから、APB受容体が関与しており、代謝型グルタミン酸受容体である可能性が大きいことを示唆した。そして、NOはNO-GC-cGMPを介して短波長系錐体入力シナプスを制御していると考えられた。暗順応網膜のH1型水平細胞へのNO投与で分光感度が明順応様の変化を引起し、また逆にNO消去剤(NOを吸着する物質)であるヘモグロビンの投与により、明順応網膜のH1型水平細胞の分光感度を暗順応様へと変化させたことから、NOが網膜で放出されており、NOが明順応信号として機能していることを示した。また、ドーパミンの阻害剤ハロペリドール存在下でヘモグロビンの灌流は、明順応と逆の作用を引起した。このことはドーパミンとNOとが独立に明順応様作用を引起していることを示唆した。

### 2.2 NO関連物質のH1水平細胞分光入力抵抗への影響

鯉網膜のH1水平細胞への短波長錐体入力シナプスのチャンネルは、APB受容体とcGMPが関与していることを示したが、NOの前駆物質アルギニンあるいはNO合成阻害剤NMMA(monomethyl-L-arginine)を細胞内注入しドーパミン存在下で膜抵抗を測定した。(1)ア

ルギニンは入力抵抗の色光波長差と暗時の膜抵抗を増大させ、(2)NMMAの作用はその逆であった。以上からNOはNO-GC-cGMPを介した短波長系の膜抵抗増大型シナプスを制御していることを抵抗測定からも確認した。

### 2.3 鯉網膜におけるNOの産生の微量計測

GRX(graphite reinforcement carbon)電極を用いた炭素微小電極センサーに工夫を加え、一酸化窒素、ドーパミン、セロトニン、アスコルビン酸等の物質が混合した状態での各濃度を生体内と同様のリンゲル液等の緩衝液中で同時に計測する方法を開発し(特許7件)、伝達物質等の同時計測が可能であることを示した。

## 3. 今後の研究展開の方向

コイの網膜神経回路網のH1型水平細胞において、明順応で青領域の感度低下により分光感度の形状が先鋭化し、この水平細胞における特異的シナプスが可塑的であり、そのシナプスがAPBに感受性があり、NOにより調節可能であり、NOがドーパミンと同様に明順応信号として働いていることを見出した。また逆に、明順応網膜においてヘモグロビン、またはAPB投与で、暗順応効果が生じた。これは、H1型水平細胞に存在する短波長(多分、青)感受性錐体視細胞入力からの伝達物質で閉じるというチャンネルよりなる奇妙な神経シナプスに起因することを示唆した。明順応信号としてのNOがシナプスのイオンチャンネルの抵抗を減少させること。そして、その結果としてH1型水平細胞の入力抵抗の色特異的变化、さらに分光感度特性、受容野の制御が出来ることを明らかにした。さらに、実験の過程において、炭素微小電極センサーを用いてリンゲル液等の溶液中における化学伝達物質の微量計測法の開発をした。以上のようにNOが、可塑性化学シナプスの制御因子として、明順応信号を担う分子として重要な役割をしていることが分かった。

しかしNOが、(1)直接的にチャンネルに作用しているのか、(2)cGMP、Ca等の細胞内情報伝達物質を介して間接的に作用しているのかを解明することは、今後の課題である。まだ成果としては出ていないが、アマクリン細胞からなるシンシチウム(ギャップ結合を介して形成された細胞間結合)におけるギャップ結合と化

学シナプスの各チャンネルが光およびcAMPによって制御されうることを示唆する結果を得つつある。

## 参考論文

- 1) Furukawa, T., Yamada, M., Petruv, R., Djamgoz, M.B.A. & Yasui, S. "Nitric oxide, 2-amino-4-phosphonobutyric acid and light/dark adaptation modulate short-sensitive synaptic transmission to retinal horizontal cells". *Neuroscience Research*, 27, 65-74. (1997)
- 2) Yamada, M. & Saito, T. "Dual component in receptive field centre of bipolar cells in carp retina". *Vision Research*, 37, 2331-2338. (1997)
- 3) Djamgoz, M.B.A., Petruv, R., Yasui, S., Furukawa, T. & Yamada, M. Modulation of chromatic difference in receptive field size of H1 horizontal cells in carp retina - dopamine- and APB-sensitive mechanisms. *Neuroscience Research*, 30: 13-24. (1998)
- 4) Yamada, M., Sasa, T., Hirasawa, H. & Shiells, R.A. "Light stimulates an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> in carp retinal On-bipolar cells". *Journal of Physiology*, 509, 66P. (1998)
- 5) Hirasawa, H. & Yamada, M. "Chromatic difference of postsynaptic current in horizontal cells in carp retina". *Neuroscience Research*, Supplement 22, 333, (1998)
- 6) Miyazaki, K., Matsumoto, G., Yamada, M., Yasui, S. & Kaneko, H. "Simultaneous voltammetric measurement of nitrite ion, dopamine, serotonin with ascorbic acid on GRC electrode". *Electrochimica Acta*, 44, 3809-3820. (1999)
- 7) Yamada, M., Fraser, S.P., Furukawa, T., Hirasawa, H., Katano, K., Djamgoz, M.B.A. and Yasui, S. "Effects of nitric oxide, light adaptation and APB on spectral characteristics of H1 horizontal cells in carp retina". *Neuroscience Research*, 34, 309-319. (1999)
- (8). Satoh, T.-O. & Yamada, M. "A bradycardiac agent ZD7288 blocks the hyperpolarization- activated current (I<sub>h</sub>) in retinal rod photoreceptors". *Neuropharmacology*, 39, 1284-1291 (2000)

## 特許

- 1) 金子浩子 山田雅弘 重松征史 根岸明 川窪隆昌 須田吉久 (1997) “炭素微小電極及びその製造方法”(特許 第2574495号)

- 2) 金子浩子 根岸明 山田雅弘 重松征史 川窪隆昌 須田吉久 (1997) “炭素微小電極及びその製造方法”(特許 第2574523号)
- 3) 金子浩子 山田雅弘 重松征史 水谷亘 根岸明 川窪隆昌 須田吉久 (1997) “先細炭素微小電極及びその製造方法”(特許 第2655742号) (1997.5.30)
- 4) 金子浩子 山田雅弘 根岸明 川窪隆昌 須田吉久 (1997) “炭素微小センサー電極及びその製造方法”(特許 第2816262号)
- 5) 山田雅弘 金子浩子 宮崎勝彦 (1997): “窒素酸化物及び神経伝達物質の計測方法”(特許 第288438号) (1997.11.7)
- 6) 金子浩子 山田雅弘 (1998) “酸素センサーおよび酸化窒素センサーと、これらセンサーによる酸素および酸化窒素の検出方法”(特許 第2780152号)
- 7) Kaneko, A., Yamada, M., Shigematsu, Y., Mizutani, W., Kawakubo, T., Negishi, A. & Suda, Y. (1998) Konische Kohlenstoff-Mikroelektrode und Verfahren zu ihrer Herstellung. (先細炭素微小電極及びその製造方法) (ドイツ特許 DE 4123534 C2) (1998.10.29)

## 当該研究担当者等

### 1) ラボ構成員(総数10名)

職員(3名) 山田雅弘\* 眞島利和 加藤 薫(超分子部)  
職員以外(7名) 清水秀明(超分子部併任) Richard Shiells, Kaj Djupsund(招聘研究員), 金子浩子(共同研究), 佐藤知興, 平沢 統(筑波大学連携大学院生), 城宝浩(技術指導)

### 2) その他の研究協力者

Nicholas Hartel(招聘研究員) 築瀬 純(技術指導), 佐々隆寿(筑波大学連携大学院生), 安井湘三, 古川徹生(九州工大)

\*ラボリーダー