

網膜視細胞の光応答発生機構に関する
生理工学的研究

1997年1月

博士(工学)

小 椋 俊 彦

豊橋技術科学大学

網膜視細胞の光応答発生機構に関する 生理工学的研究

1997年 1月

博士(工学)

小椋 俊彦

豊橋技術科学大学

網膜視細胞の光応答発生機構に 関する生理工学的研究

論文要旨

網膜は、外界の複雑な光情報を並列に受容し、中枢での視覚発現に必要な情報を処理・抽出する2次元多層神経回路網である。網膜を構成する各種神経細胞の中でも視細胞は光情報を膜電位応答へと変換し、視覚の初期過程を担う細胞である。脊椎動物の視細胞は、光刺激に対して過分極応答し、2次ニューロンである水平細胞や双極細胞へと情報を伝達する。従って、網膜の機能研究を進める上で、視細胞の光受容機構や情報の処理・伝達機構を解明することは必須と考えられる。

網膜視細胞は、形態的に外節・内節・シナプスから構成されており、それぞれ機能的役割を担っている。外節は光刺激を受けることにより、光感受性電流を変化させ、内節はこの電流変化と内節に存在する各種のイオン電流との相互作用により光応答を形成する。さらに、シナプスは、光応答に従い情報伝達物質の放出量を変化させ、双極細胞や水平細胞へと情報を伝達する。こうした視細胞の光応答には、強いフラッシュ光照射時の一過性の過分極応答や光応答終了時の振動現象などが見られるが、これらの現象は外節の光感受性電流のダイナミクスだけでは説明できず、内節の各イオン電流の関与が示唆されている。しかしながら、電気生理実験を主体とした分析的手法だけでは、光応答時の内節の各イオン電流の働きを解析することは困難であるため、これまでのところ光応答に伴う諸現象の発生機序は解明されていない。そこで本研究では、生理学的知見に従う数理モデルを用いたシミュレーション解析により、光応答に対する内節の各イオン電流や細胞内 Ca^{2+} 機構の働きを考察した。解析に用いた数理モデルは、内節のイオン電流機構と細胞内 Ca^{2+} 機構を含み、Torreらの外節モデルと統合することにより構築した。

このモデルを用いたシミュレーション解析の結果、強いフラッシュ光照射時の一過性の過分極応答や光応答終了時に発生する振動現象は、各イオン電流の動的・非線形な特性と細胞内 Ca^{2+} 機構の Ca^{2+} バッファの特性に起因することが示唆された。こうした結果は、神経細胞の特性を忠実に再現したモデルのシミュレーション解析により、初めて得られた知見であり、今後の生理学的な解析に明確な見通しを与えるものである。

こうしたシミュレーション解析の結果から、光受容メカニズムの情報処理過程には、細胞内 Ca^{2+} が深く関与していることが示唆された。そこで、視細胞の細胞内 Ca^{2+} 機構を解析するため、Ca 指示薬 Fura-2 を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度の光計測を行い、単離視細胞の

Ca²⁺濃度変化を時空間的に解析した。その結果、定常状態では、外節のCa²⁺濃度が内節に比べて高く、これが細胞外から外節内へのcGMP依存性チャネルを介したCa²⁺の流入により生じることが示された。さらに、内節の膜電位依存性Ca²⁺チャネルによるCa²⁺濃度上昇についても高カリウム溶液灌流実験を行い、チャネルの分布密度がシナプス側で高いことが示された。こうした結果は、外節と内節間において、Ca²⁺が相互拡散しうること示唆するものであり、外節の光応答生成に内節の細胞内Ca²⁺機構が関与する可能性を示すものと考えられる。

網膜視細胞は、広帯域、高感度な光センサであり、その光応答発生機構は工学的な見地からも興味深いものである。本研究で提案した網膜視細胞のイオン電流モデルや細胞内Ca²⁺機構の解析結果は、光刺激強度変化に的確に適応するインテリジェントイメージセンサ等の開発の足掛かりになるものと考えられる。

Physiological Engineering Study on Light Response Mechanisms in the Photoreceptor

ABSTRACT

Retina receives light signal and preprocesses visual information for the brain. Photoreceptors are the first order neuron in the retina and transform the light signal into an electrical signal. This signal is transmitted to the second order neurons in the retina (horizontal and bipolar cells). Therefore, the information processing in photoreceptors is essential for understanding the retinal signal processing.

The photoreceptor consists of the three functional parts, the outer segment, the inner segment and the synaptic terminal. The outer segment transforms light signal into the photocurrent. The inner segment generates the voltage response with ionic currents in the membrane according to the photocurrent from the outer segment. The synaptic terminal releases glutamate as the result of voltage response in the inner segment.

In this thesis, in order to elucidate how the photoreceptor realizes these functions, a mathematical model of the photoreceptor was constructed. The inner segment was described by each ionic current in the membrane and by the intracellular calcium mechanism. The synaptic terminal was modeled in terms of the spatio-temporal characteristics of the calcium entry. To simulate the light response, the inner segment and the model of the synaptic terminal were connected with the phototransduction model (Torre et al.). The role of individual ionic currents in the photoreceptor for the light response was analyzed by computer simulation. The simulation results suggest that the transient hyperpolarization to the bright flash and the oscillation after prolonged hyperpolarization in rod are generated by the dynamical and nonlinear ionic currents and by the intracellular calcium mechanism in the inner segment. In conclusion, since the present model reflects the biophysical process from phototransduction to voltage response, the model can be used for analyzing the light response properties of the photoreceptors quantitatively.

The intracellular calcium system in the photoreceptor plays an important role for modulation of the phototransduction mechanism and/or ionic current characteristics. In order to

clarify the calcium mechanisms, we analyzed the spatio-temporal properties of the intracellular calcium in the photoreceptor by using a calcium imaging system. The results suggest that :1) at the resting state the outer segment of intracellular free Ca^{2+} level was higher than the inner segment, which resulted in cGMP activated channels of outer segment, 2) depolarization of photoreceptor by high K^+ solution increased Ca^{2+} concentration of inner segment, which is generated by voltage activated Ca^{2+} channel.

The physiological engineering approach, which used the photoreceptor model based on experimental data, was an important method to reveal the relation between physiological phenomena and underlying mechanisms. The result of this thesis would contribute to development of the high quality photosensor.

目次

1 序論	8
1.1 研究の背景と目的	8
1.2 本論文の構成	10
2 網膜の構造と機能	13
2.1 網膜の構造と機能	13
2.2 網膜神経細胞の応答	15
2.3 視細胞の構造と機能	17
2.4 視細胞の構造	17
2.4.1 外節の構造	17
2.4.2 内節の構造	18
2.4.3 視細胞シナプスの構造	18
2.5 視細胞外節の機能	21
2.5.1 光変換機構の生化学的過程	21
2.5.2 光感受性電流	21
2.5.3 細胞内 Ca^{2+} 機構と明順応	24
2.6 視細胞のモデル	24
2.7 光変換機構のモデル	25
2.7.1 細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化	26
2.7.2 cGMP 濃度と光感受性電流	27
2.7.3 光変換機構の生化学的過程	28
2.7.4 光変換機構のシミュレーション	28
2.8 まとめ	33

3	視細胞内節のイオン電流モデル	34
3.1	はじめに	34
3.2	視細胞内節のイオン電流	34
3.3	視細胞内節のモデル化	38
3.3.1	膜電位依存性カリウム電流 (I_{Kv})	41
3.3.2	過分極活性型内向き電流 (I_h)	43
3.3.3	Ca^{2+} 電流 (I_{Ca})	46
3.3.4	細胞内 Ca^{2+} 機構のモデル記述	48
3.3.5	Ca^{2+} 依存性塩素電流 ($I_{Cl(Ca)}$)	51
3.3.6	Ca^{2+} 依存性カリウム電流 ($I_{K(Ca)}$)	51
3.3.7	漏れ電流 (I_l)	52
3.4	膜電位固定のシミュレーション	52
3.5	膜電流固定のシミュレーション	57
3.6	まとめ	60
4	視細胞モデルを用いた光応答解析	61
4.1	はじめに	61
4.2	内節モデルと外節モデルの統合	61
4.2.1	外節モデルの改良	61
4.2.2	内節モデルの改良	62
4.3	視細胞杆体の光応答シミュレーション	64
4.3.1	視細胞モデルの光応答	64
4.3.2	杆体のピーク時刻特性	65
4.4	杆体の振動現象とシミュレーション解析	70
4.4.1	杆体の振動現象	70
4.4.2	光応答振動時のシミュレーション	70
4.4.3	光応答振動現象の解析	73
4.5	TEA 混入によるスパイク現象	77
4.5.1	杆体のスパイク応答	77
4.5.2	スパイク応答のシミュレーション	77
4.5.3	スパイク現象の解析	77
4.6	TEA 混入による定常スパイク応答	83

目次	7
4.7 まとめ	86
5 網膜視細胞の細胞内 Ca^{2+} 機構の時空間特性の解析	87
5.1 はじめに	87
5.2 実験の概要	88
5.2.1 実験標本の作成	89
5.2.2 実験の溶液	90
5.2.3 測定装置と実験系	90
5.3 定常状態における細胞内 Ca^{2+} 濃度の分布	93
5.4 Ca^{2+} free 溶液灌流実験	95
5.5 Li^{+} 灌流実験	95
5.6 IBMX 灌流実験	97
5.7 内節の膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルの影響	98
5.8 むすび	103
6 結論	104
謝辞	106
参考文献	107

第 1 章

序論

1.1 研究の背景と目的

生物は、絶えず外界の環境に適応すべく進化を繰り返し、今日の繁栄を築き上げてきた。こうした生物進化の歴史は、自然環境に適応できた生物種のみが生存を許され、適応できなかった生物種が亡び去る形で推移している。従って、個々の生物にとって、外界の情報をいかに受容し、いかに適切に処理するかが自然界に生存するための必須条件となる。こうした生物進化の歴史の中で、生物は、膨大な情報を瞬時に識別し、より本質的で重要な情報へと変換する柔軟な情報処理機構を備えるに至った。例えば、我々が普段無意識に行っている歩行や手の動き、他者の顔の認識や言語によるコミュニケーションなどは、現在の高度に発達したコンピュータ技術を持ってしても実現困難な課題である。このような生物の持つ柔軟な情報処理機能を工学的に実現するためには、生物の持つ情報処理機構の基礎研究を進め、その中から新たな情報処理理論の提案が必要であると考えられる。

生物における情報処理機構は、脳・神経系における膨大な数の神経細胞のネットワークにより実現されている。また、個々の神経細胞自身も高度な情報処理を担う一つの処理単位であるため、脳・神経系は多数の高度なプロセッサが複雑に結合したシステムと捉えることができる。個々の神経細胞における情報処理の基本機構は、細胞膜を透過する各種のイオン電流と細胞内の分子メカニズムから構成されている。こうした神経細胞の情報処理機構の解明には、従来より電気生理学的アプローチと生化学的アプローチが行なわれてきた。電気生理学的アプローチでは、ガラス微小電極を用いて光や薬物に対する各細胞の電位変化、イオン電流の特性変化が詳細に調べられており、各細胞の光応答特性、膜特性が次第に明らかにされてきた。また、生化学的アプローチでは、細胞内の各種蛋白質、酵素が介在する細胞

内情報伝達機構の解明や Ca^{2+} による細胞内蛋白質への修飾作用の解析が進められている。しかしながら、こうした手法により得られた知見は、特定のイオン電流や細胞内情報伝達物質に関する限定されたものであり、実際の応答時にはこれらが複雑に相互作用を及ぼしているため、これらの個々の知見のみから、その機能の全貌を知ることは困難である。そのため、神経細胞全体の機能を解明するためには、生理実験より得られた個々の知見を基に数理モデルを構築し、シミュレーションによりその動的特性を解析する構成的方法が必要となる。従来よりイオン電流特性に基づく数理モデルとしては、Hodgkin-Huxley モデルが代表的であり、このモデルの基本的概念を用いて多くの神経細胞のモデル化が進められて来た。さらに最近では、細胞内の Ca^{2+} 濃度変化がイオン電流特性や膜電位特性に重大な影響を及ぼすことが示され、現在そのモデル化と動的特性の解析が進められている。こうした生物の有する情報処理機構の中でも、外界の光情報を受容処理する視覚器官（網膜）は、膨大な情報を識別し、より重要な情報へと変換する器官であり、その処理構造は階層的でボトムアップ的に処理が進められていく。最近では、こうした視覚系の持つ優れた情報処理機構が見直され、シリコン網膜などの工学的応用が注目を集めている。

さて、網膜は、外界の複雑な光情報を並列的に受容し、中枢での視覚発現に必要な情報を処理・抽出する 2 次元多層神経回路網である。網膜には、光を受容する視細胞、この情報を視覚中枢へと伝達するための双極細胞、神経節細胞、これらの細胞に時空間的に修飾を与える水平細胞、アマクリン細胞の主に 6 類の神経細胞が存在する。こうした網膜神経細胞の中でも視細胞は、光情報を膜電位応答へと変換する光情報処理の初期過程を担う細胞である。視細胞は、形態的に外節・内節・シナプスから構成されており、それぞれ機能的役割を担っている。外節は、光刺激を受けることにより、光感受性電流を変化させ、内節はこの電流変化と内節に存在する各種のイオン電流との相互作用により光応答を形成する。さらに、シナプスは、光応答の変換に従い情報伝達物質の放出量を変化させ、双極細胞や水平細胞へと情報を伝達する。このように視細胞の情報処理機構には、外節の光刺激の受容から光感受性電流までの生化学的過程と光感受性電流と内節の各イオン電流の相互作用による電気生理学的過程、さらにこれら双方に修飾作用を及ぼし、2 次ニューロンへの情報伝達を制御する細胞内 Ca^{2+} 機構が存在している。こうした、それぞれの機構や過程は、全ての細胞に共通に存在しており、細胞機能の発現に本質的な役割を果たしている。そのため、全ての機構を含む視細胞は、細胞の情報処理機構解明のための貴重な標本の一つとして捉えることができる。

そこで、本研究では視細胞を対象として細胞の有する情報処理機構を生理工学的に解析し、内節に存在する各イオン電流や細胞内 Ca^{2+} 機構の光応答生成に関する働きについて調べることを目的とした。そのため、生理学的知見に基づいた、視細胞のイオン電流モデルと

細胞内 Ca^{2+} 機構のモデルを構築し、膜電流固定実験や光応答に関するシミュレーション解析を進めた。その結果、内節の膜電位固定実験で生じたスパイク応答の各イオン電流成分を分離し、こうした応答がどのイオン電流成分により形成されるかを解析した。さらに、光応答に見られる一過性の過分極応答や光応答終了時の振動応答についても、イオン電流レベルでの考察を行った。

こうしたシミュレーション解析を通して、光応答の生成に関する細胞内 Ca^{2+} 機構の修飾作用が示唆された。そこで、視細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度について、 Ca^{2+} 指示薬 Fura-2 を用いた光計測を行い、その特性を時空間的に解析した。その結果、定常状態における細胞内 Ca^{2+} 濃度の分布や Na^+ - Ca^{2+} , K^+ 交換機構停止時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、さらに I_{Ca} による Ca^{2+} 濃度の変化などについて新たな生理学的知見を得ることができた。

以上のように本論文では、視細胞の光刺激の受容から光応答生成までの過程をイオン電流モデルや細胞内 Ca^{2+} 濃度の光計測により解析し、イオン電流レベルでの光応答発生機構の解析を進めた。こうした結果は、視細胞の光センサとしての優れた特性を解明し、将来的には外界の光刺激に柔軟に対応するインテリジェント光センサの開発に結び付くものと期待される。

1.2 本論文の構成

本論文は、全6章より構成されている。第2章では、網膜の形態的特徴とその機能、網膜における視細胞の働きとその重要性について具体的に述べ、さらに視細胞の光受容から膜電位応答生成に関するこれまでの知見を紹介する。第3章では、内節の各イオン電流の働きを調べるために、そのイオン電流モデルの構築を行った。まず、Maricqらの内節の膜電位固定実験の結果を基に、各膜電位依存性電流のモデル化を行い、さらに Ca^{2+} 依存性電流のモデルを構築するために、細胞内 Ca^{2+} 機構のモデルに関し研究が進んでいる外節や心筋細胞の生理学的知見を導入し構築した。このモデルのシミュレーションにより、膜電流固定時の各イオン電流成分を分離でき、スパイク発生時の各イオン電流の働きを明確にした。

第4章では、光応答時の内節の各イオン電流や細胞内 Ca^{2+} 機構の働きを解析するため、Torreらの光変換機構のモデルと3章で構築した内節モデルとの統合を行った。これにより、光受容から膜電位応答までのシミュレーションが可能となり、光応答に見られる一過性の過分極応答や光感受性電流と膜電位のピーク時間特性、光応答終了時の振動現象について、その生成メカニズムの考察を行った。その結果、ピーク時間特性や光応答終了時の振動現象などに $I_{(\text{Ca})}$ と細胞内 Ca^{2+} 機構が深く関与していることが示唆された。

第 5 章では、視細胞の光応答の生成に関与する細胞内 Ca^{2+} 機構の解析を進めるため、Fura-2 を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度の光計測を行った。これにより、視細胞内の Ca^{2+} 濃度を時空間的に解析し、外節から内節への Ca^{2+} の拡散が認められ、内節と外節の細胞内 Ca^{2+} 機構の相互作用の存在が示唆された。最後に、第 6 章で、本研究の結論と今度の研究課題を展望する。以上の本研究の構成については、図 1.1 に示した。

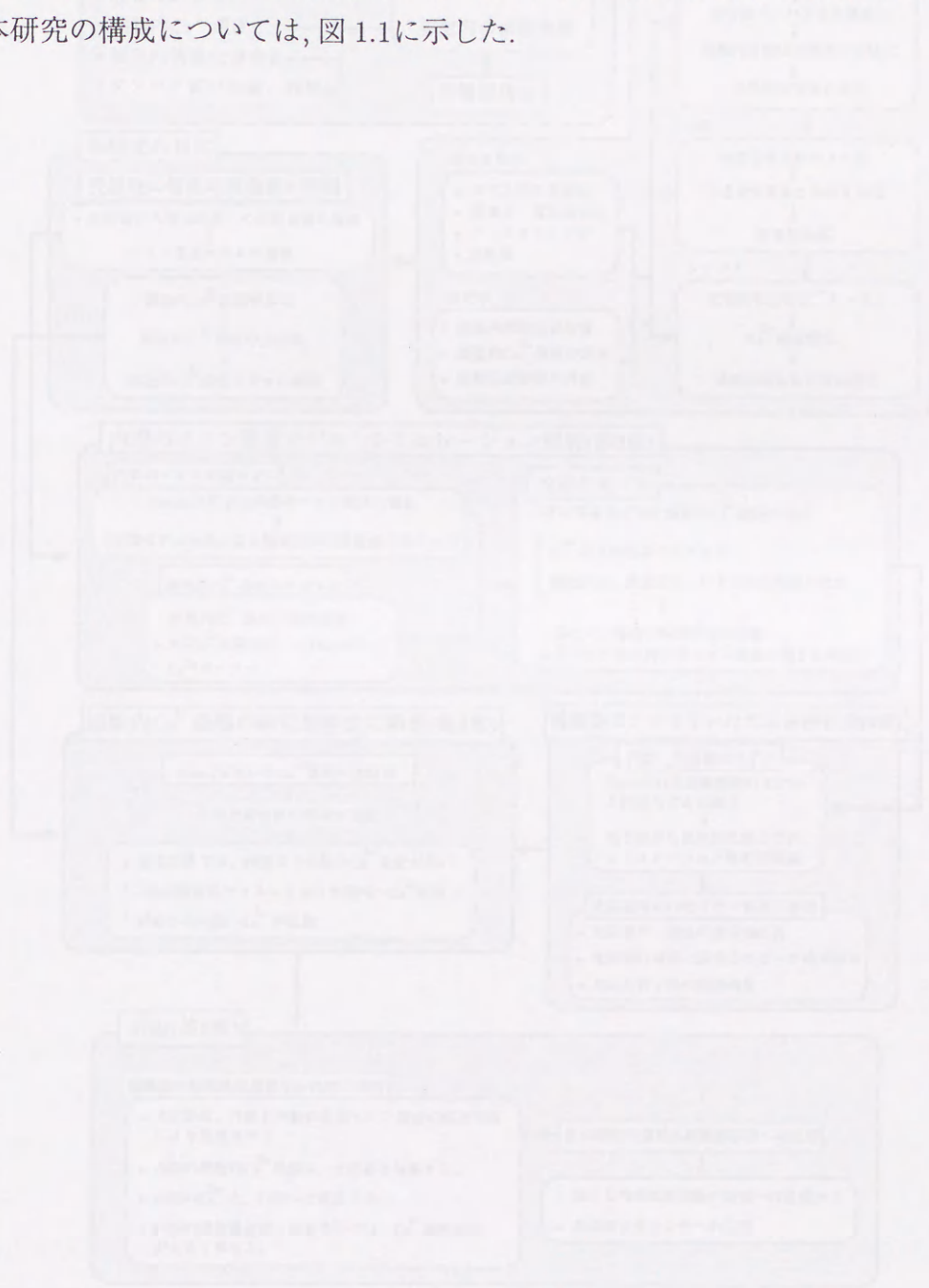


図 1.1 本研究の構成図

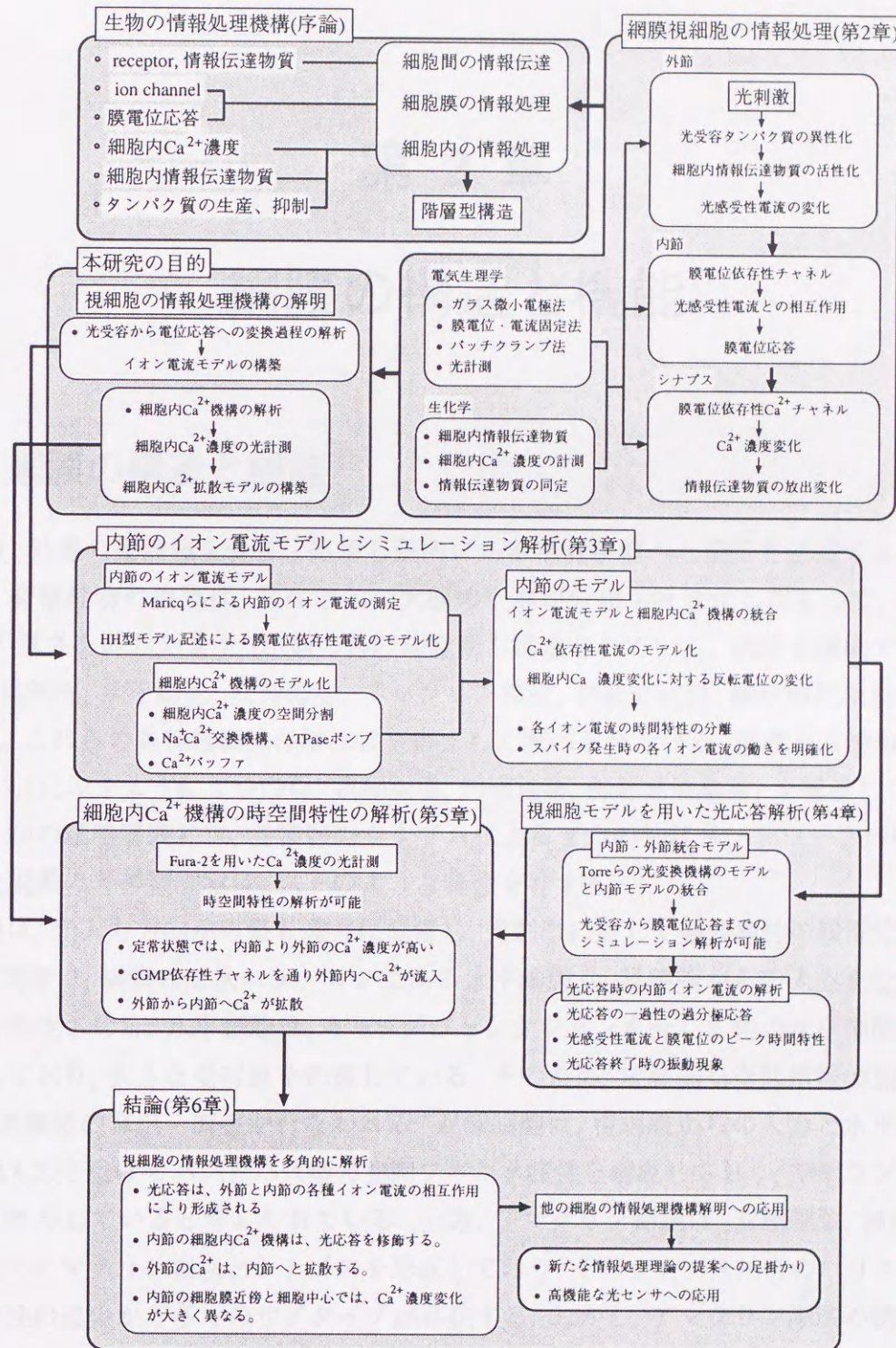


図 1.1 本研究の構成図

第 2 章

網膜の構造と機能

2.1 網膜の構造と機能

網膜は、外界の光情報を受容・処理し脳内にある視覚中枢へと情報を伝達する感覚器官である。脊椎動物の網膜は、発生学的に脳の一部が分化・特殊化したもので、一般に約 $200\mu\text{m}$ の厚さを持ちおよそ 10^8 個の神経細胞から構成されている。網膜を構成する神経細胞には、視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞、網状層間細胞の 6 種類が存在し、これらの各神経細胞は層状に規則正しく配列されている。網膜の 6 種類の神経細胞は、図 2.1 に示すように 3 つの層 (視細胞層、内顆粒層、神経節細胞層) を構成しており、これらの 3 つの細胞層間には、各細胞のシナプスによる 2 つの神経ネットワークの層がある。こうした網膜の各神経細胞は、以下のような特徴を有する。

視細胞は、光入力方向から最も遠方に位置し、光刺激に対して過分極性の緩電位変化を発生する。同様に、網膜の 2 次ニューロンである水平細胞も、視細胞からの入力を受けて緩電位変化を発生させる。水平細胞は、ギャップジャンクションを介して他の水平細胞と電気的に結合しており、大きな受容野を形成している。そのため、広範囲な空間情報の加算・平滑化、平均光強度の算出・調整が行なわれる。双極細胞は、視細胞からの入力と水平細胞からの抑制的入力を受けてバンドパス型の空間フィルタ特性を構成しており、空間コントラストの向上に寄与していると考えられている。一方、アマクリン細胞は、双極細胞、神経節細胞、さらに他のアマクリン細胞とシナプスを形成しており、そのシナプス結合のバリエーションや細胞特性の違いから多くのサブタイプが存在する。しかし、アマクリン細胞の機能については、まだ十分に解明されていないため、今後の研究の進展が望まれる。網膜の出力である神経節細胞は、双極細胞などからの緩電位応答を神経インパルスに変換し視覚中枢へと情報を伝達する。

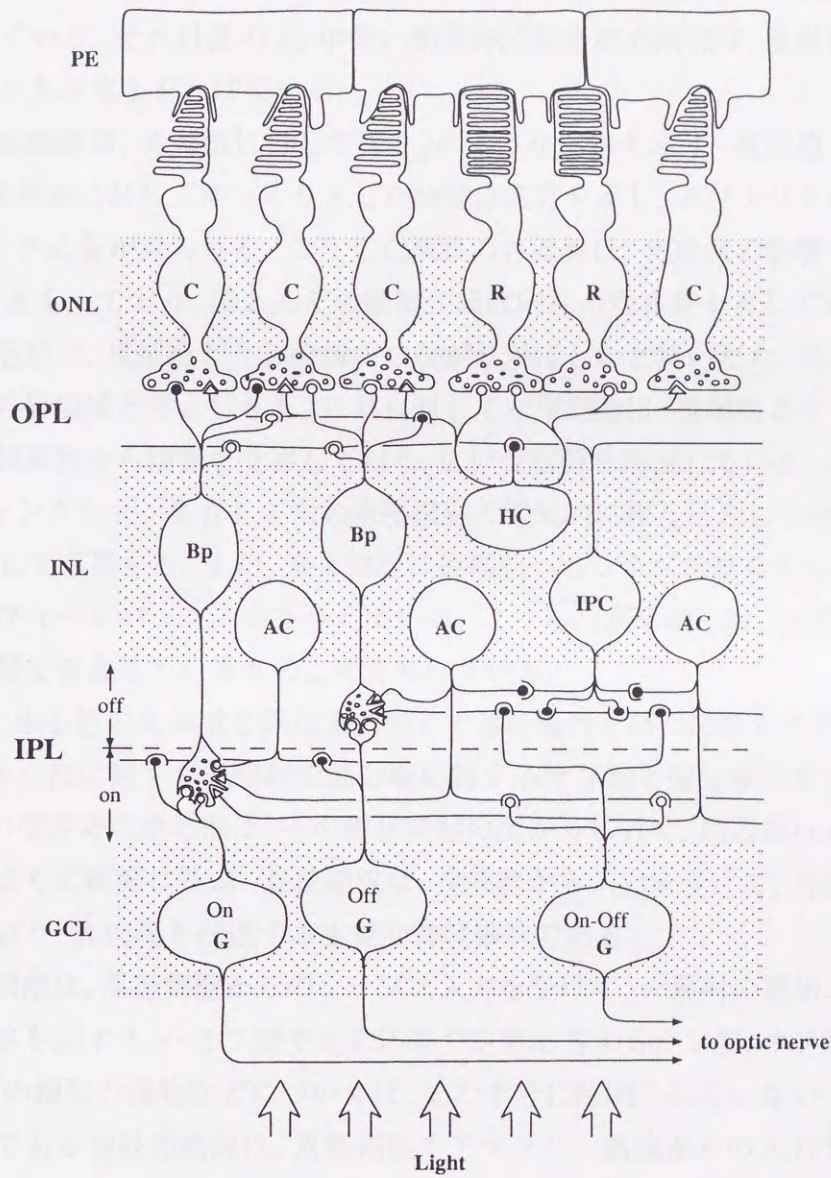


図 2.1 網膜神経回路の模式図^[1]

R: 杆体, C: 錐体, HC: 双極細胞, Bp: 双極細胞, AC: アマクリン細胞, G: 神経節細胞.

2.2 網膜神経細胞の応答

網膜における単一細胞内記録は、1953年 Svaetichin により行なわれ、水平細胞が緩電位応答を示すことが見いだされた。この緩電位は、最初に見いだした Svaetichin にちなんで S 電位と呼ばれている。それ以後の40年間に網膜神経回路網の研究は、実験技術や解析手法の向上に伴い大きな進歩をとげている。

網膜の各神経細胞は、光刺激に対して図2.2のような応答を示す。視細胞・水平細胞・双極細胞では、光刺激に対してゆっくりとした緩電位応答を示し、アマクリン細胞や神経節細胞では、スパイク応答が見られる。こうした網膜の各細胞は、光刺激の影響を受ける空間的範囲(受容野)をもっており、ほとんどの細胞がほぼ円形の受容野を有している。

視細胞の受容野は、視細胞どうしの横のつながりがほとんど無いため、光を受容する外節の大きさが受容野領域と考えられる。これに対して水平細胞は、視細胞よりも形状が大きいので広範囲の視細胞から情報を受容しており、広い受容野を形成している。さらに水平細胞はギャップジャンクションを介して他の水平細胞と電気的に相互結合しており、より広範囲の光刺激に対して応答する。また、水平細胞は視細胞へとシナプス結合をしており、視細胞に対する負のフィードバック入力を与えている。こうした水平細胞は、視細胞-双極細胞間の信号伝達経路を修飾しているものと考えられている。

双極細胞は、中心部の光刺激と周辺光刺激とで逆の極性を持つ応答が発生する。また、双極細胞には、中心部に対する光照射で過分極応答するオフ型と脱分極応答するオン型がある。双極細胞の受容野の中心部は、その樹状突起の広がり近く、周辺部は水平細胞からの抑制性入力により広範囲に及ぶ。双極細胞は、視細胞から入力を受けて、神経節細胞へと情報を伝達しており、光情報を伝達する主要な神経細胞である。

アマクリン細胞は、双極細胞からのシナプス入力を受けて、光照射の開始と終了時に一過性の過分極応答を示すオン-オフ型や定常応答や定常応答するオン型、オフ型が知られている。しかし、この細胞の機能などについては、まだ十分に解明されていない。

網膜の出力である神経節細胞は、双極細胞やアマクリン細胞からの入力を受けて活動電位を発生させ、軸索を通してインパルスの中樞へ伝達する。神経節細胞は、発火様式の違いにより、オン中心型とオフ中心型、オン-オフ型に分類されている^[4]。

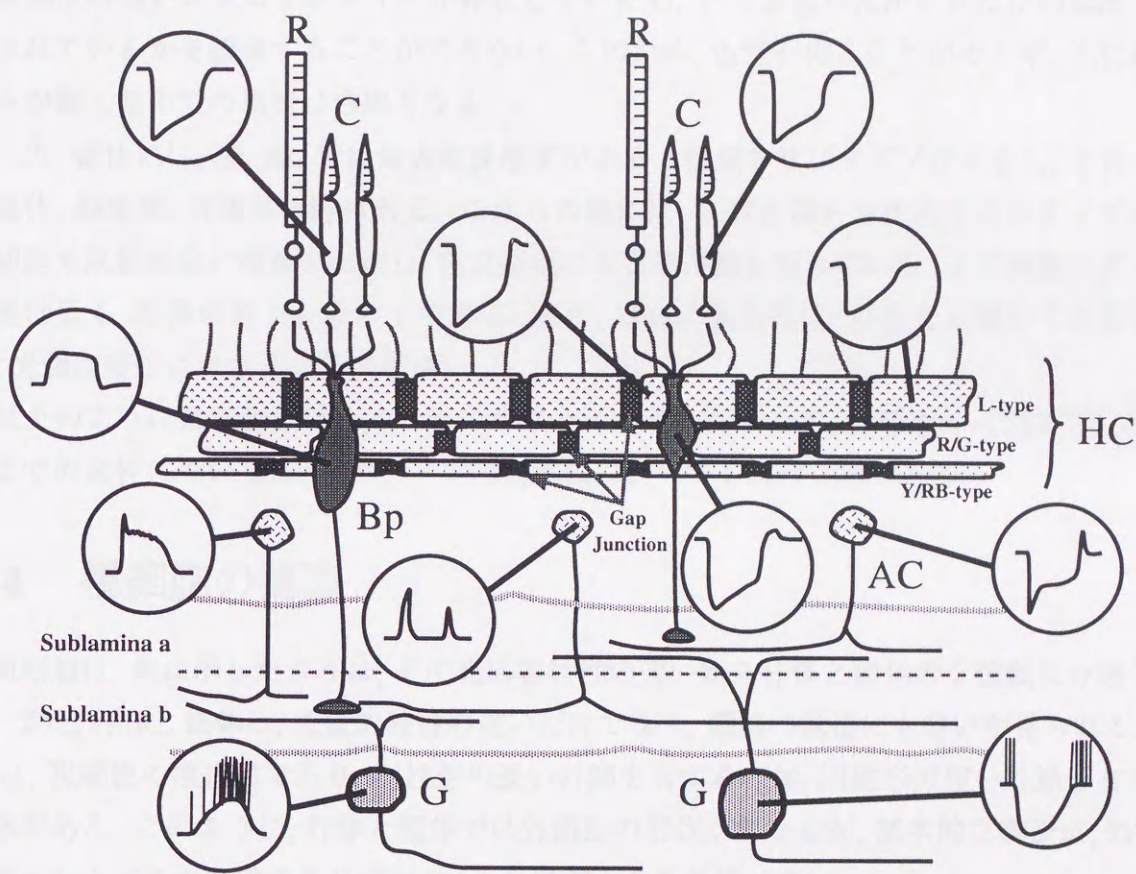


図 2.2 網膜内神経細胞の応答波形

視細胞, 水平細胞, 双極細胞の光応答は, 緩電位変化を示し, アマクリン細胞や神経節細胞ではパルス状の応答が見られる.

2.3 視細胞の構造と機能

視細胞は、外界の光情報を受容し、膜電位応答へと変換する網膜の1次ニューロンである。視細胞は、光受容感度や最大波長感度の特性の違いにより杆体と錐体に分類される。杆体は、光受容感度が高く光応答時間が長い。この細胞は暗中所ける光受容を担当しており、夜空に輝く星を見る時に我々の網膜内では、主に杆体視細胞が働いている。杆体には、最大波長感度の違いによるサブタイプが存在しないため、どの波長の光がどれだけの強度で受容されているかを認識することができない。このため、色覚を得ることができず、主に杆体のみが働く暗中所の風景は白黒となる。

一方、錐体には、赤、緑、青に最大波長感度がある3種類のサブタイプが存在し、それぞれ赤錐体、緑錐体、青錐体と呼ばれる。これらの錐体は、反対色信号を生成する各タイプの水平細胞や双極細胞に情報を伝達し、色覚発現に本質的役割を担っている。この細胞の光受容感度は低く、杆体の約100分の1である。また、錐体の光応答は、杆体と比較して非常に速く、光強度変化に対する追従性が高い。

以上のように視細胞にはいくつかのサブタイプが存在するが、光受容から膜電位応答形成までの過程については、どのタイプの視細胞においてもほぼ同様である。

2.4 視細胞の構造

視細胞は、先に示したように、その光応答特性の違いから杆体と錐体の2種類に分類できる。また、杆体と錐体は、機能的特性の違いだけでなく、細胞の構造にも違いが見られる。図2.3は、視細胞の模式図であり、円柱形の長い外節を有する杆体、円錐形の短い外節を有する錐体がある。このように、杆体と錐体では外節部の形状が異なるが、基本的な構造は、外節・内節・シナプスから構成されており、それほど大きな差異はない。

2.4.1 外節の構造

外節の内部には、円盤状の多数のディスクが存在し、それらが多数積み重なった構造をしている。この外節ディスク上には、光を吸収して構造を変化させる視物質 (photopigment) が多数存在しており、この視物質の構造変化により最初の視覚信号が伝達される。ディスクは、脂質二重層より構成されており、図2.4-(c)に示すような袋状の構造となっている。ディスクの大きさは、厚さが約40Åほどであり、通常の生体膜よりも柔らかく流動性がある。ディスクは、外節の根底部でいつも新しく生成され、それが次第に先へと押し上げられ色素細胞

に吸収されていく。外節のこうした構造により、光刺激は光感受性電流の変化へと変換される。

2.4.2 内節の構造

内節には核とミトコンドリアが存在し、外節の光変換機構で必要な蛋白質や酵素の生成を行なっている。また、トリ、カメ、カエルの錐体内節では、着色された1個の大きな油滴が存在し、錐体の色知覚との関連や入射光を外節に集めるレンズとしての働きが示唆されている。さらに、内節は外節の光感受性電流の変化と、内節の各イオン電流との相互作用から光応答を形成する。

2.4.3 視細胞シナプスの構造

視細胞シナプスの終端は大きく広がっており、網膜の2次ニューロンである双極細胞や水平細胞の樹状突起と結合している(図2.5)。視細胞のシナプス部では、暗時において化学伝達物質のグルタミン酸が放出されており、光刺激を受けて膜電位が過分極することにより放出量が減少する。双極細胞や水平細胞では、このグルタミン酸の放出量変化に伴う濃度変化を受け、グルタミン酸レセプターの電流を変化させることで、視細胞からの情報を受容している。



図2.5 視細胞のシナプス構造

この図は、視細胞のシナプス構造を示している。視細胞のシナプス部では、暗時において化学伝達物質のグルタミン酸が放出されており、光刺激を受けて膜電位が過分極することにより放出量が減少する。双極細胞や水平細胞では、このグルタミン酸の放出量変化に伴う濃度変化を受け、グルタミン酸レセプターの電流を変化させることで、視細胞からの情報を受容している。

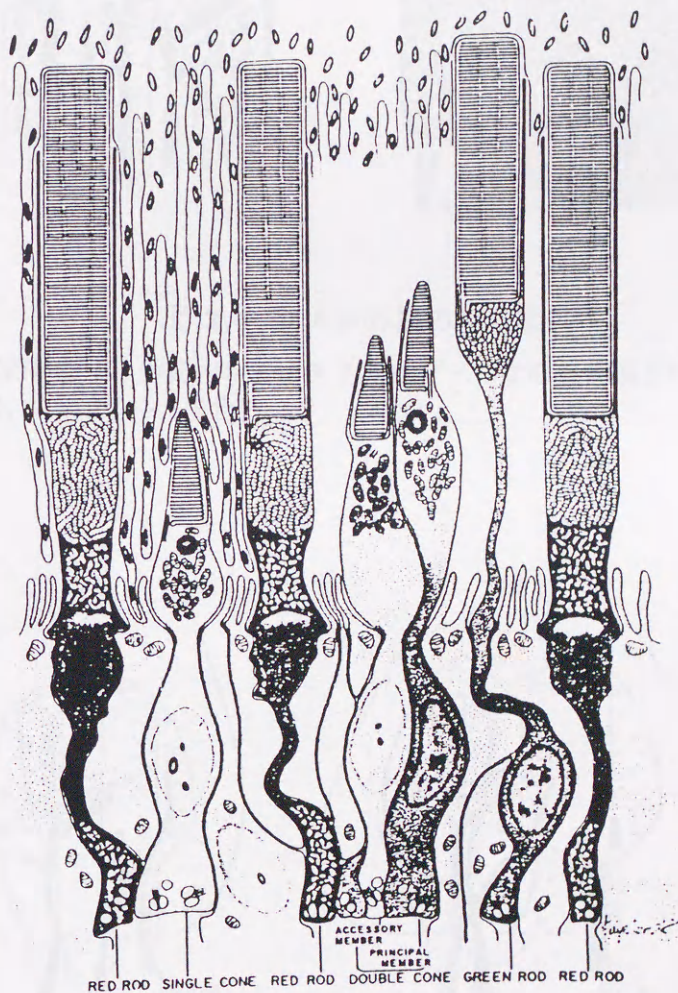


図 2.3 視細胞の模式図 [2]

カエルの視細胞の模式図, 杆体 (rod)・錐体 (cone)・復錐体 (double cone) の 3 種類が見られる. 視細胞は, 外節, 内節, シナプスより構成されている.

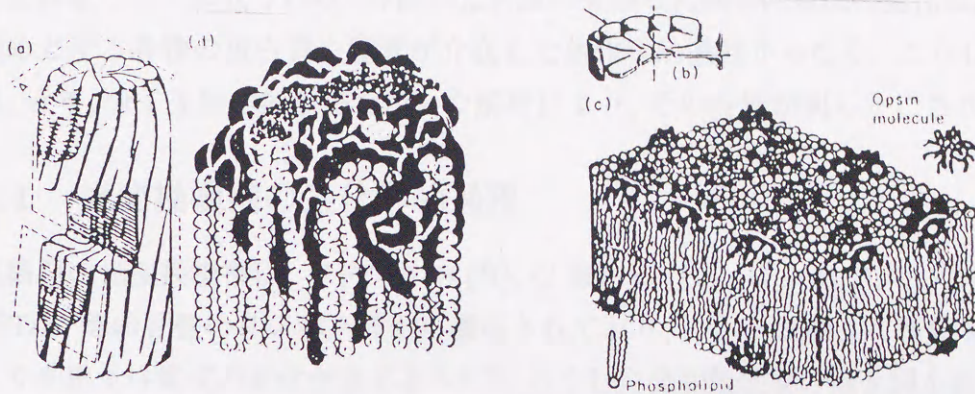


図 2.4 カエル外節の模式図^[3]

(a) 外節の立体構造, (b) 外節内のディスク, (c) ディスクの生体膜とロドプシン, (d) リン脂質 (白色), ロドプシン (黒色)

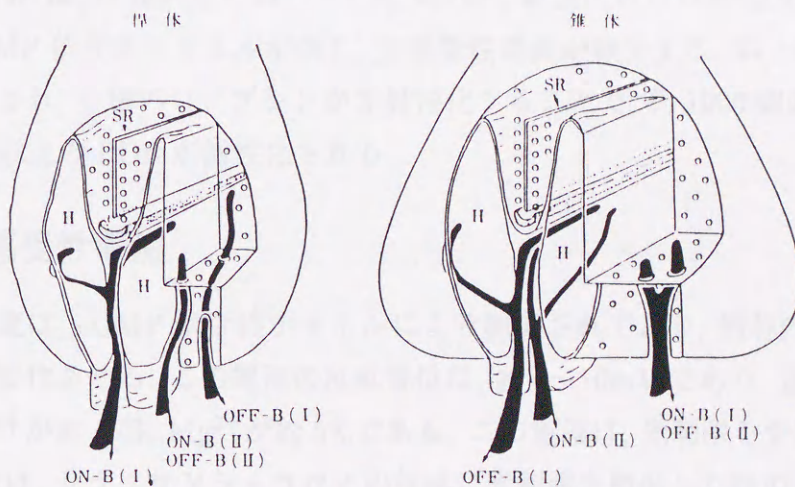


図 2.5 視細胞シナプスの模式図^[4]

SR: シナプス・リボン. H: 水平細胞の樹状突起, これはシナプス・リボンをはさむように位置している. ON-B・OFF-B: 双極細胞の樹状突起.

2.5 視細胞外節の機能

視細胞の光応答は、外節での光刺激に対する光感受性電流の変化と内節の各イオン電流の相互作用として形成される。外節の光刺激の受容と光感受性電流の変化は、光受容蛋白質を始めとする各種の蛋白質や酵素が介在した生化学的過程からなる。こうした機構については、近年、分子生物学的手法を用いた解析により、その特性が明らかにされつつある。

2.5.1 光変換機構の生化学的過程

視細胞の光変換機構は、ロドプシン (R), G 蛋白質 ($G_{t\alpha}$, $G_{t\beta}$, $G_{t\gamma}$), ホスホジエステラーゼ (PDE) 等の各種のタンパク質から構成されており、これらが相互に情報を伝達することにより光感受性電流の変化が生じる^[5, 6, 7]。こうした光変換機構の概念図を図 2.6 に示す。図 2.6-(a) は、暗時における各蛋白質の結合状態を示しており、いずれの蛋白質も暗時には停止状態にある。外節に光が照射されると、光感受性タンパク質であるロドプシンが形状変化(光異性化)を引き起こす。この光異性化したロドプシンに G 蛋白質が触れると、G 蛋白質と結合していた GDP が離れて、GTP と結合する。これにより、結合していた 3 つの G 蛋白質のサブユニットが $GTP-G_{t\alpha}$ と $G_{t\beta} \cdot G_{t\gamma}$ に分裂する(図 2.6-(b))。分裂した $GTP-G_{t\alpha}$ は、ホスホジエステラーゼ (PDE) の γ サブユニットと結合し PDE を活性化させる(図 2.6-(c))。活性化した PDE は、cGMP を GMP へと加水分解し細胞内の cGMP 濃度を減少させる。これにより、cGMP 依存性チャネルが閉じ、光感受性電流が減少する。以上の伝達過程により光情報は増幅され、一個のロドプシンが光異性化することで、約 1000 個の G 蛋白質の活性化と 100 万個以上の PDE が活性化される。

2.5.2 光感受性電流

光感受性電流は、cGMP 依存性チャネルにより制御されており、細胞内の cGMP 濃度に従い電流量を変化させる。この電流の反転電位は、約 0~10mV であり、透過イオンは、 Na^+ が約 80%, Ca^{2+} が約 15%, Mg^{2+} が約 5% である。この電流は、光刺激を受けることにより減少する。図 2.7 は、トラフサンショウウオの杆体に光刺激を照射した時の光感受性電流の時間特性を示している。この図から、光強度が増すに従い応答時間が長くなり、プラトーな部分が生じていることを確認できる。また、背景光強度が強くなるに従い、光感受性電流の応答時間が短縮され、光感度が低下する。この現象は明順応と呼ばれ、光変換機構の大きな特徴の一つである。現在のところ明順応は、光変換機構の生化学的過程に対する、 Ca^{2+} の調節作用によるものと考えられている。

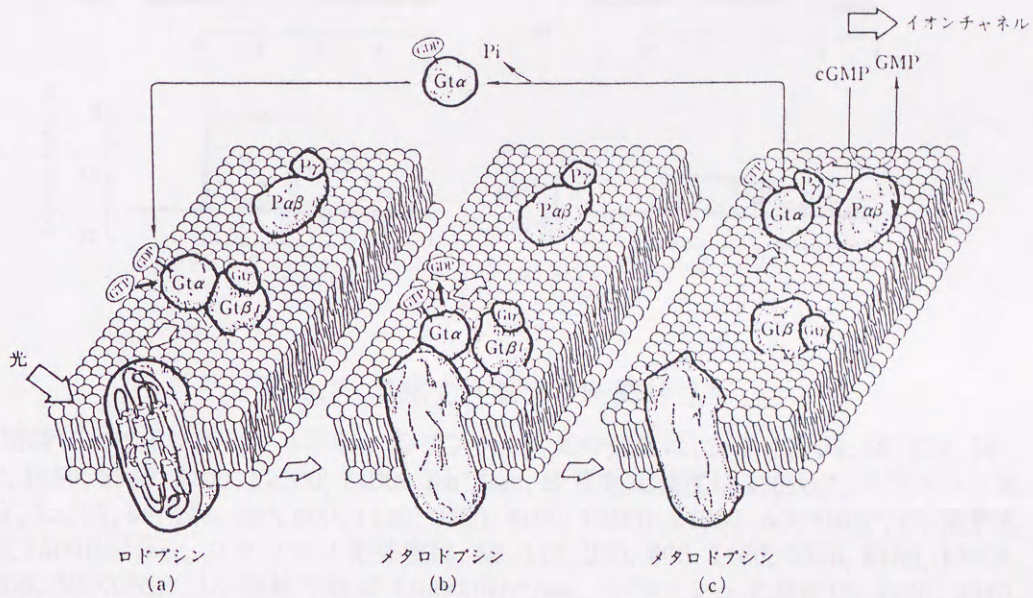


図 2.6 脊椎動物視細胞の光情報変換機構^[8]

$G_{t\alpha}$, $G_{t\beta}$, $G_{t\gamma}$ はそれぞれ G 蛋白質のサブユニット. $P_{\alpha\text{-beta}}$ はホスホジエステラーゼの $\alpha \cdot \beta$ サブユニット. P_{γ} は inhibitor である γ サブユニット.

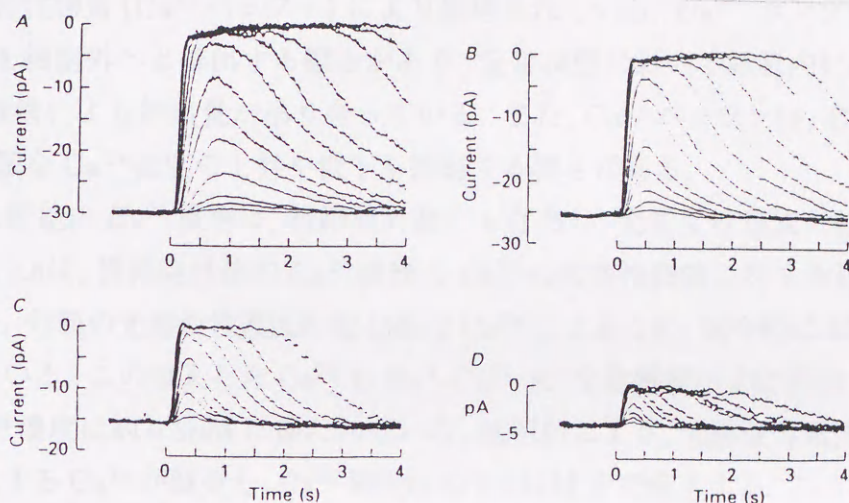


図 2.7 光感受性電流の時間特性⁶⁾

A: 暗時におけるフラッシュ応答、各フラッシュ光の強度は、3, 6, 12, 25, 58, 115, 230, 600, 1150, 2360, 6100, 12500, 24000 Rh*/sec, B: 背景光強度は 120Rh*, フラッシュ光強度, 12, 25, 58, 115, 230, 600, 1150, 2350, 6100, 12500, 24000, 50000Rh*, C: 背景光強度 1300Rh*/sec, フラッシュ光強度は、58, 115, 230, 600, 1150, 2350, 6100, 12500, 24000, 50000Rh*, D: 背景光強度 110000Rh*/sec, フラッシュ光強度は、1150, 2350, 6100, 12500, 24000, 50000, 98000, 205000, 480000, 980000, 2050000Rh*.

2.8 視細胞のモデル

1924年、ドイツの生理学者ヘンリッヒ・ワルターは、網膜の光感受性細胞の電位特性について、その電位が暗時には一定のレベルに維持され、光刺激により急激に低下し、その後徐々に回復する特性を示すことを発見した。この発見は、網膜の光感受性細胞が電位変換を行う能力を持つことを示唆した。その後、1937年にH. K. Hartlineは、ワルターの発見をさらに詳しく研究し、網膜の光感受性細胞が電位変換を行う能力を持つことを示唆した。その後、1974年にH. K. Hartlineは、網膜の光感受性細胞が電位変換を行う能力を持つことを示唆した。

2.5.3 細胞内 Ca^{2+} 機構と明順応

細胞内の Ca^{2+} は、細胞内情報伝達物質の活性化やその生成を調節する働きがある。このため、神経細胞に限らず多くの細胞では、 Ca^{2+} 濃度変化を情報伝達媒体として、情報の受容・処理・伝達を行なっている。神経細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は、約 $0.1\mu\text{M}$ であり、外部溶液と比較して約 1 万分の 1 の低濃度に保たれている。こうした低い Ca^{2+} 濃度は、 Ca^{2+} 排出機構や Ca^{2+} 結合性物質 (Ca^{2+} バッファ) により維持されている。 Ca^{2+} ポンプは、細胞内に流入した Ca^{2+} を細胞外へと排出する働きがあり、定常状態において細胞内に流入する Ca^{2+} と Ca^{2+} 排出機構による排出量が釣り合っている。また、 Ca^{2+} バッファは、 Ca^{2+} の吸収や排出により、急激な Ca^{2+} 濃度の上昇や低下を抑制する働きがある。

こうした細胞内 Ca^{2+} 機構は、視細胞外節にも存在し、光感受性電流に修飾作用を及ぼしている。図 2.8 は、視細胞外節の Ca^{2+} 機構と Ca^{2+} の光変換機構に対する修飾作用を示す概念図である。外節の光感受性電流の約 15% は Ca^{2+} によるため、暗中時に Ca^{2+} は常時細胞内に流入している。この流入した Ca^{2+} を Na^+ - Ca^{2+} , K^+ 交換機構が常時排出しており、暗時の細胞内 Ca^{2+} 濃度は約 $0.3\mu\text{M}$ に保たれている。光照射により、光感受性電流が減少すると細胞内に流入する Ca^{2+} が減少し、 Ca^{2+} 濃度は約 $0.14\mu\text{M}$ まで低下する。こうした細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は、光変換機構を構成するグアニレートシクラーゼや S-モジュリンの働きを調節している。

光照射により Ca^{2+} 濃度が低下すると、cGMP の合成酵素であるグアニレートシクラーゼの働きが活性化し cGMP の生産量が増加する。これと同時に光異性化したロドプシンのリン酸化を促進させる S-モジュリンが活性化され、G 蛋白質への情報伝達効率が減少する。このため、PDE の cGMP 分解能力は抑制される。以上をまとめると、細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下は、cGMP の生産量を増加させ分解量を減少させる。この結果、 Ca^{2+} 濃度が低い時の光感受性電流は、より迅速に定常状態まで復帰する。この効果は、背景光照射時の光応答の高速化や明順応の基本的な機構と考えられている。

2.6 視細胞のモデル

表 2.1 は、現在までの視細胞モデルに関する研究についてまとめたものである。視細胞のモデル化に関する研究の歴史は古く、まず、1970 年に Baylor, Fuortes が錐体の膜に関する等価回路モデルを提案した^[12]。このモデルは、固定コンダクタンスと可変コンダクタンスの 2 種類のコンダクタンスしか含まれていないことや、可変コンダクタンスに時間特性が無いことなど、概念モデルの域を出ないものであった。次いで、1974 年に Baylor, Hodgkin,

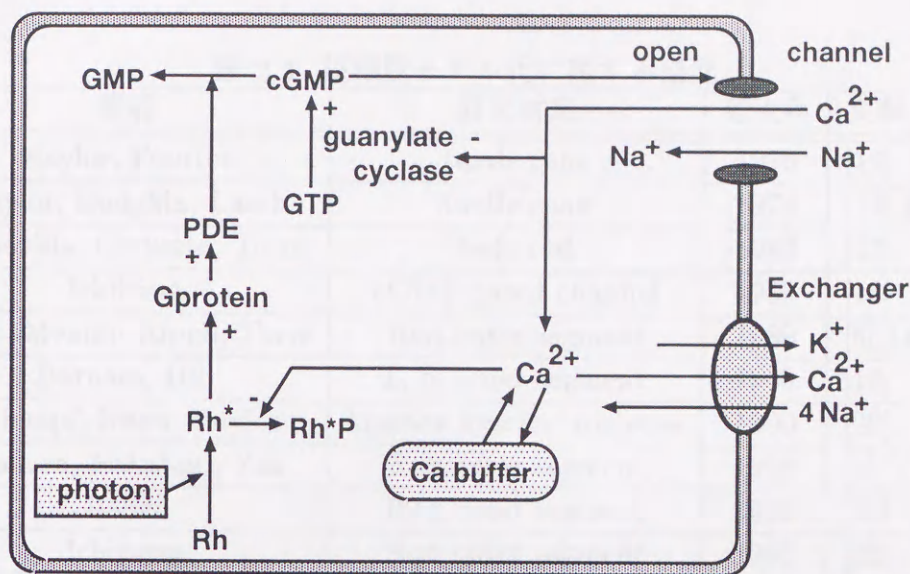


図 2.8 光変換機構の概念図^[9, 10, 11]

Rh:ロドプシン, PDE:ホスホジエステラーゼ, GTP:グアニンヌクレチド, GMP:グアニンモノフォスフェート.

Lamb らが、カメの錐体について総括的なモデルを提案した^[13]。このモデルは、光の受容から細胞内情報伝達物質のカスケード構造による増幅、そして膜コンダクタンスの変化から構成されており、実験データとも良く一致した。しかし、その後の研究により、情報伝達のカスケード構造が実際の外節と大きく異なることや、内節部のイオン電流特性を考慮に入れていないなどの問題点が明らかとなった。

最近では、外節の数理モデルについて、Torre らが光変換機構の生化学過程に基づいたモデルを提案し、生理実験データとの良い一致を得た^[14]。このモデルは、光変換機構のカスケード構造と細胞内 Ca^{2+} 機構を採り入れており、そのパラメータの設定も生理実験データを参考に決定されている。このため信頼性も高く、本研究の目的の一つである、内節・外節統合化モデルの構築には、この外節モデルを用いた。

2.7 光変換機構のモデル

Torre らの外節モデルは、細胞内の Ca^{2+} 濃度変化と cGMP の変化、さらにロドプシンとそれ以降の G タンパク質、ホスホジエステラーゼ (PDE) の活性化の推移について構築されたものである。ここで彼らは、 Ca^{2+} と cGMP の代謝が光感受性チャネルをコントロールする主な物質であると考え、細胞内の Ca^{2+} の働きが cGMP を生産するグアニレートシクラー

表 2.1 視細胞モデル化に関する研究

著者	研究対象	発表年	文献
Baylor, Fuortes	turtle cone	1970	[12]
Baylor, Hodgkin, Lamb	turtle cone	1974	[13][15][16]
Capovilla, Cervetto, Torre	bufo rod	1980	[17]
Ichikawa	cGMP gated channel	1989	[18]
Forti, Menini, Ripoli, Torre	Rod outer segment	1989	[6][14]
Barnaes, Hill	I_h of inner segment	1989	[19]
Schnapf, Nunn, Baylor	Macaca Fascicularis cone	1990	[20]
Tamura, Nakatani, Yau	Rod outer segment	1991	[5]
Bauer	Rod outer segment	1996	[21]
Ichikawa	Rod outer segment	1996	[22]

ぜに対してのみであると仮定した。以下では、この外節モデルの具体的記述とその意味について示す。

2.7.1 細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化

視細胞外節の Ca^{2+} 濃度は、cGMP 依存性チャネルを透過して流入する Ca^{2+} と Na^+-Ca^{2+} , K^+ 交換機構による Ca^{2+} の排出, Ca^{2+} バッファによる吸収・放出により決定される。こうした細胞内 Ca^{2+} 機構は、式 (2.1), (2.2) のよう記述される。

式 (2.1) の右辺第 1 項は、光感受性電流によって流入する Ca^{2+} であり、第 2 項は Na^+-Ca^{2+} , K^+ 交換機構による排出、第 3 項と 4 項は Ca^{2+} バッファによる吸収と排出を示したものである。従って、この式は細胞内に流入する Ca^{2+} と流出する Ca^{2+} の差から、細胞内の Ca^{2+} 濃度変化を求めている。式 (2.2) は、 Ca^{2+} が吸着したバッファ基質濃度を求めるもので、式 (2.1) のバッファ記述とは、吸収と排出が逆となるため符号が反転する。

$$\dot{c} = \frac{J_{Ca}}{2Fv} - \gamma_{Ca}(c - c_o) - k_1(e_T - c_b)c + k_2c_b \quad (2.1)$$

$$\dot{c}_b = k_1(e_T - c_b)c - k_2c_b \quad (2.2)$$

c	: 細胞内の Ca^{2+} 濃度 [μM]
J_{Ca}	: 流入する Ca^{2+} 電流の合計 [pA]
F	: ファラデー定数
v	: 杆体外節の容量 [ℓ]
e_T	: 細胞内のバッファ基質濃度の [μM]
c_b	: Ca^{2+} 吸着バッファの濃度 [μM]
c_o	: Na^+ - Ca^{2+} , K^+ 交換機構の最低排出濃度
γ_{Ca}	: Na^+ - Ca^{2+} , K^+ 交換機構の Ca^{2+} 排出速度 [sec^{-1}]
k_1	: バッファの Ca^{2+} 吸着速度 [$\mu\text{M sec}^{-1}$]
k_2	: バッファの Ca^{2+} 排出速度 [sec^{-1}]

2.7.2 cGMP 濃度と光感受性電流

光感受性電流は、細胞内の cGMP 濃度に従いその電流を変化させる。暗中での cGMP の濃度は、グアニレートシクラーゼによる生産速度 A と PDE による分解速度 \bar{V} により決定される。分解される cGMP の速度は、光照射による PDE の活性化により増加する。このことから cGMP に関する以下の式が導かれる。

$$\dot{g} = A - g\left(\bar{V} + \frac{K_{\text{cat}}}{K_M} \text{PDE}^*\right) \quad (2.3)$$

g	: 細胞内の cGMP 濃度 [μM]
$\frac{K_{\text{cat}}}{K_M}$: 活性化した PDE の効果 [μMsec^{-1}]

上式の $\frac{K_{\text{cat}}}{K_M}$ を単純に $1\text{sec}^{-1}\mu\text{M}$ とし、安定時の cGMP の値を $2\mu\text{M}$ と仮定した。また、グアニレートシクラーゼの活性化は、細胞内の Ca^{2+} によりコントロールされており、この効果が以下の式のようなシグモイド関数状に変化すると仮定した。

$$A = \frac{A_{\text{max}}}{1 + \left(\frac{c}{K_c}\right)^m} \quad (2.4)$$

A_{max}	: グアニレートシクラーゼ活性化の最大値 [μMsec^{-1}]
K_c	: グアニレートシクラーゼの効果を半減させる Ca^{2+} 濃度
m	: 1 個のグアニレートシクラーゼを抑制するのに必要な Ca^{2+} の個数

式 (2.4) の m と K_c は、Koch and Stryer(1988) らが求めた 4 及び $0.1\mu\text{M}$ とし、暗中における Ca^{2+} の濃度を 300nM とした。

以上の式より得られた cGMP 濃度 g と光感受性電流 J の関係は、パッチ摘出実験に従い、以下の式で記述される。

$$J = J_{\text{max}} \frac{g^3}{K^3 + g^3} \quad (2.5)$$

J_{max}	: 最大電流量, 5040[pA]
K	: 最大電流の半分となる cGMP 濃度

2.7.3 光変換機構の生化学的過程

図2.9は、視細胞外節のcGMPの制御を含む生化学的過程を示したものである。光変換機構の生化学的過程は、細部まで良く研究されているが、その速度定数などはまだ正確に測定されていない。このため、G蛋白質やPDEの活性化や不活性化の速度定数などは、生理実験データに一致するよう設定された。こうした光変換機構のモデル記述を以下に示す。

$$\dot{R}h = J_{hv}(t) - \alpha_1 Rh + \alpha_2 Rh_i \quad (2.6)$$

$$\dot{R}h_i = \alpha_1 Rh - (\alpha_2 + \alpha_3) Rh_i \quad (2.7)$$

$$\dot{T}^* = \epsilon Rh(T_{Tot} - T^*) - \beta_1 T^* + \tau_2 PDE^* - \tau_1 T^*(PDE_{Tot} - PDE^*) \quad (2.8)$$

$$\dot{P}DE^* = \tau_1 T^*(PDE_{Tot} - PDE^*) - \tau_2 PDE^* \quad (2.9)$$

Rh	: 不活性状態のロドプシン濃度 [μM]
Rh_i	: 活性化したロドプシン濃度 [μM]
T_{Tot}	: トランスジューシンの最大濃度 [μM]
T^*	: 活性化したトランスジューシンの濃度 [μM]
PDE_{Tot}	: 最大PDE濃度 [μM]
PDE^*	: 活性化したPDE濃度 [μM]
$J_{hv}(t)$: ロドプシンの光異性化速度 [$Rh^* \text{sec}^{-1}$]

以上に示したモデル記述とそのパラメータを表2.2に示した。

2.7.4 光変換機構のシミュレーション

図2.7は、光刺激強度を変化させた時の光感受性電流の時間特性を示したものであり、図2.10はこの実験と同様の条件でシミュレーションした結果である。図2.7の生理実験結果では、光感受性電流のピーク時間が光刺激強度が強くなるに従い短くなっている。この現象は、図2.10のシミュレーション結果でも良く再現されている。また、背景光照射時の光応答についても Torreらのモデルが実際の光応答を良く再現していることが確認できる。図2.11は、光応答時の光変換機構の各時間特性である。

表 2.2 視細胞外節の光変換機構の数理モデル^[14]

description of model	
change of intracellular Ca^{2+}	
$\frac{dc}{dt}$	$= \frac{J_{Ca}}{2Fv} - \gamma_{Ca} \cdot (c - c_0) - k_1 \cdot (e_T - c_b) \cdot c + k_2 c_b$
$\frac{dc_b}{dt}$	$= k_1 \cdot (e_T - c_b) \cdot c - k_2 \cdot c_b$
c_0	$= [Ca^{2+}]_i = [Ca^{2+}]_o \frac{[Na^+]_i^3}{[Na^+]_o^3} \exp\left(\frac{V_m F}{RT}\right)$
change of intracellular cGMP	
$\frac{dg}{dt}$	$= A - g \cdot \left(\bar{V} + \frac{K_{cat}}{K_M} PDE^*\right)$
A	$= \frac{A_{max}}{1 + (c/K_c)^m}$
mechanism of phototransduction	
$\frac{dRh}{dt}$	$= J_{h\nu}(t) - \alpha_1 Rh + \alpha_2 Rh_i$
$\frac{dRh_i}{dt}$	$= \alpha_1 Rh - (\alpha_1 + \alpha_3) \cdot Rh_i$
$\frac{dT^*}{dt}$	$= \epsilon Rh \cdot (T_{Tot} - T^*) - \beta_1 T^*$
$\frac{PDE^*}{dt}$	$= \tau_2 PDE^* - \tau_1 T^* (PDE_{Tot} - PDE^*)$
$\frac{PDE^*}{dt}$	$= \tau_1 T^* \cdot (PDE_{Tot} - PDE^*) - \tau_2 PDE^*$
photosensitive current	
J	$= J_{max} \frac{g^3}{g^3 + K^3}$

Explanation of model's parameter	
Change of intracellular Ca^{2+}	
c	free Ca^{2+} concentration
J_{Ca}	total Ca^{2+} current
F	Faraday's constant
v	free volume of the rod
e_T	total buffer concentration
c_b	Ca^{2+} concentration bound to the buffer
γ_{Ca}	rate of Ca^{2+} extrusion mediated by the Na^+/Ca^{2+} exchange
k_1	on rate for the binding of Ca^{2+} to the internal buffer
k_2	off rate for the binding of Ca^{2+} to the internal buffer
$[Na^+]_i$	intracellular Na^+ concentration
$[Na^+]_o$	extracellular Na^+ concentration
$[Ca^{2+}]_o$	intracellular Ca^{2+} concentration
V_m	a value of c_0 equal to about 100 [nM]
R	gas constant
T	absolute temperature
Change of intracellular cGMP	
g	free cGMP concentration
\bar{V}	a rate hydrolysed cGMP by enzyme PDE
PDE^*	activate PDE concentration
K_{cat}/K_M	a catalytic rate of PDE
A	a rate produced cGMP by enzyme guanylate cyclase
A_{max}	maximal activity of the cyclase
K_c	intracellular Ca^{2+} concentration halving the cyclase activity
m	a number of Ca^{2+} molecules necessary to inhibit a cyclase molecule
Mechanism of phototransduction	
Rh	photoexcited rhodopsin concentration
$J_{h\nu}$	flux of rhodopsin photoisomerization
Rh_i	inactive rhodopsin concentration
T_{Tot}	total trasducin concentration
T^*	activated trasducin concentration
PDE_{Tot}	total PDE concentration
PDE^*	active PDE concentration
Photosensitive current	
J_{max}	a maximal cGMP-dependent current
K	a cGMP concentration half activating the maximal current J_{max}

表 2.3 視細胞外節モデルのパラメータ^[23]

Parameter	Value	Reason of choice
α_1	50 [s^{-1}]	To fit the time course of photoresponses to dim flash of light
β_1	2.5 [s^{-1}]	
τ_1	0.2 [$s^{-1}\mu M^{-1}$]	
τ_2	5 [s^{-1}]	
α_2	0.0003 [s^{-1}]	
α_3	0.03 [s^{-1}]	
ϵ	10^6 [$M^{-1}s^{-1}$]	To have a turnover of 1000 T* per Rh*
PDE_{Tot}	100 [μM]	From Stryer(1986)
T_{Tot}	1000 [μM]	From Stryer(1986)
$\frac{K_{cat}}{K_M}$	$5 \cdot 10^7$ [$M^{-1}s^{-1}$]	From Stryer(1986)
γCa	50 [s^{-1}]	See Forti et al.(1989)
C_o	100 [nM]	
b	0.625 [$\mu Ms^{-1}pA^{-1}$]	See Forti et al.(1989)
k_1	0.2 [$s^{-1}\mu M^{-1}$]	To reproduce the kinetics of the reactivation of the photocurrent with steps of light and to have an affinity buffer with K_D close to 10 μM (Hodgkin et al. 1987)
k_2	0.8 [s^{-1}]	
e_T	500 [μM]	
\bar{V}	0.4 [s^{-1}]	From Hodgkin and Nunn(1988)
A_{max}	65.6 [μMs^{-1}]	To have 2 μM for the resting level of free cyclic GMP
K_c	100 [nM]	From Koch and Stryer(1988)
K^3	1000 [μM^3]	From Zimmerman and Baylor (1986), and Colamartino et al.(1991)
J_{max}	5040 [pA]	See Forti et al.(1989)

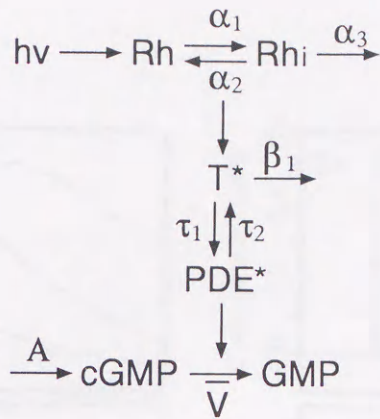


図 2.9 外節における cGMP 調節機構の概念図^[14]

hv: 光量子. Rh · Rhi: 活性化 · 不活性化したロドプシン. T* · PDE*: 活性化した G 蛋白質 (トランスジューシン) とホスホジエステラーゼ.

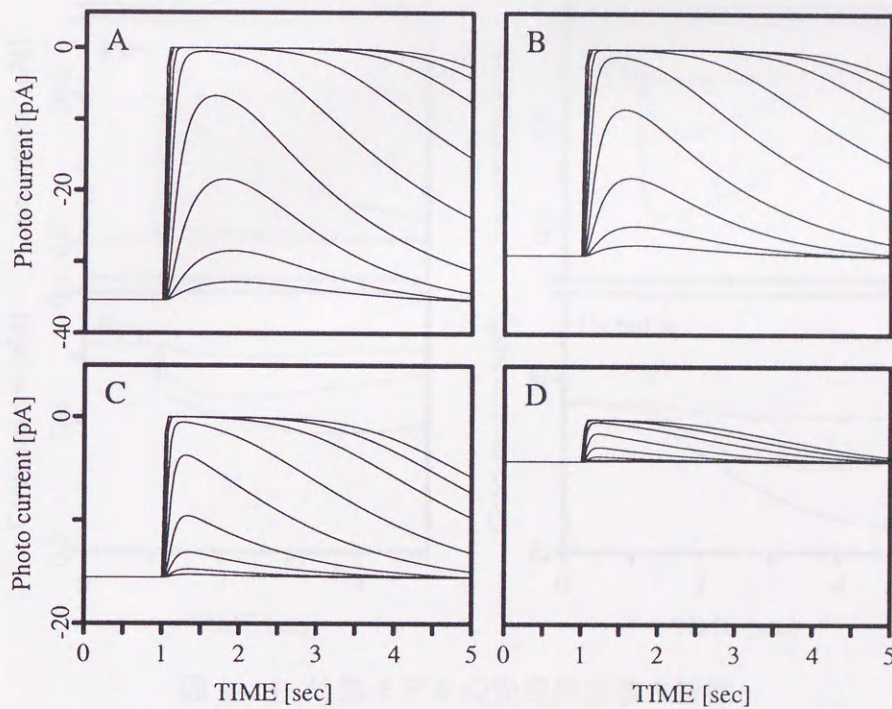


図 2.10 外節モデルのシミュレーション結果

A: 光感受性電流の時間特性, 光刺激強度は, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 Rh*/sec, 照射時間は 50msec (光感受性電流は, Ca^{2+} 電流 J_{Ca} の 2 倍とした). B: 背景光照射時の光感受性電流の時間特性, 背景光強度は 0.01 Rh*/sec, 光刺激強度は A と同じである. C: 背景光強度が 0.1 Rh*/sec 時の特性. D: 背景光強度 1.0 Rh*/sec 時の時間特性.

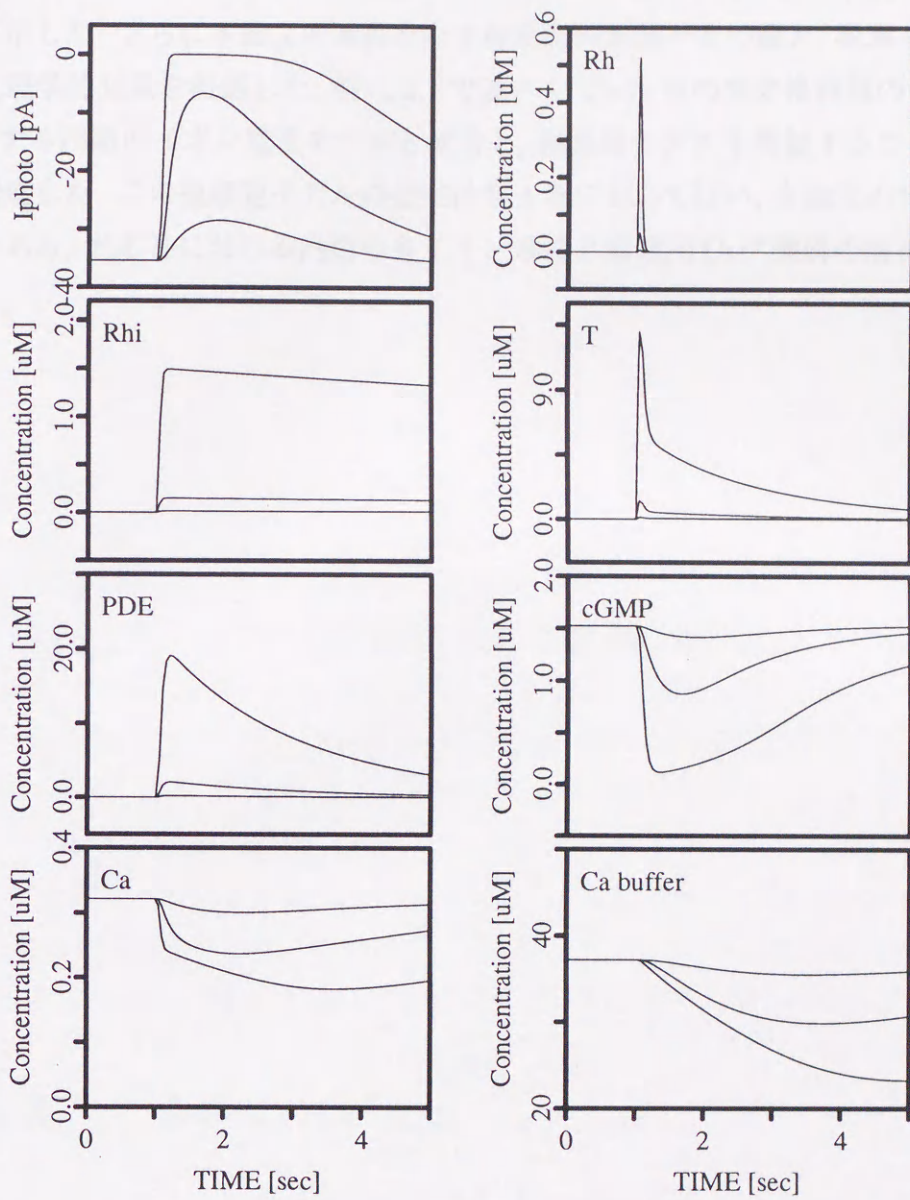


図 2.11 外節モデルの光変換機構の特性

Iphoto: 光感受性電流. 光刺激強度は, 0.3, 3.0, 30 Rh*/sec, 刺激時間は 50msec. Rh: 活性化前のロドプシン濃度. Rhi: 活性化したロドプシン濃度. T: 活性化した G 蛋白質濃度. PDE: 活性化した PDE 濃度, cGMP: 細胞内の cGMP 濃度, Ca: 細胞内 Ca^{2+} 濃度. Ca buffer: Ca^{2+} を吸着させたバッファ基質濃度.

2.8 まとめ

本章では、まず視細胞の形態的特徴とその機能について述べ、視細胞の網膜における重要性について示した。さらに本論文の基幹をなす視細胞の形態やその働き、数理モデルに関する従来の生理学的知見を概観した。特に2.7で述べた Torre らの光変換機構のモデルは、第3章で提案する内節のイオン電流モデルと統合し、視細胞モデルを構築するため、その内容を詳細に記述した。この視細胞モデルの提案は第4章において行い、本論文の重要な研究成果の一つである、光応答における内節の各イオン電流と細胞内 Ca^{2+} 機構の解析に結び付くものである。

第 3 章

視細胞内節のイオン電流モデル

3.1 はじめに

内節には、膜電位依存性電流や Ca^{2+} 依存性電流が存在し、外節の光感受性電流と内節の各イオン電流の相互作用として光応答が形成される。視細胞内節の膜電位依存性電流や Ca^{2+} 依存性電流については、最近の膜電位固定実験により、その時間特性や電流-電圧特性 (I-V 特性) が明らかにされつつある^[24]。しかしながら、こうした生理実験結果は、各イオン電流のかなり限定された条件下における動特性を示すもので、全てのイオン電流が相互に関与する膜電位応答などの解析は困難である。そこで本章では、これまでの生理実験から得られた知見を基に錐体内節のイオン電流モデルを構築し、このモデルが錐体の膜電位応答や膜電流応答と等価な振舞いを示すことを確認・検証した。さらに膜電流固定時のシミュレーションを行い、スパイク応答の発生に関与するイオン電流成分の解析を行った。

3.2 視細胞内節のイオン電流

神経細胞に存在するイオン電流の種類や特性は、目的とするイオン電流のみが透過するように、他のイオン電流を薬物や溶液の濃度を変化させて阻害し、膜電位固定法を用いて測定される。この時の膜電流変化を調べることにより、ある膜電位におけるチャネル開閉の時間特性を知ることが可能となる。こうした膜電位固定実験は、概念的に図 3.1 のような回路で構成され、指令電位を与えることにより細胞内電位測定電極との差が無くなるように、電流注入電極より神経細胞へ電流が注入される。この時測定される電流値は、神経細胞に存在する各イオン電流の総和となる。

Schwartz や Maricq らは, こうした手法を用いて視細胞内節のイオン電流の種類や特性を抽出した^[24, 25]. 図 3.4は, Maricq らがトカゲ錐体を用いて膜電位固定実験によって得た内節の膜電流特性である. 図 3.4-A は, 左より細胞外溶液を通常の状態 (Ctrl), 膜電位依存性カリウム電流の阻害剤である tetraethylammonium (TEA) 混入時, さらに TEA と Ca^{2+} 電流・ Ca^{2+} 依存性電流の阻害剤である Co^{2+} 混入時の膜電流応答を示している. コントロール時の膜電流応答は, 各イオン電流の総和として観測されるため, 非常に複雑な時間特性と膜電流特性を示す. さらに, TEA を外部溶液に加えた時は, 膜電位依存性カリウム電流が阻害されるため, コントロール時と比較して膜電流が減少する. TEA と Co^{2+} 混入時は, 膜電位依存性電流と Ca^{2+} 依存性電流が全てブロックされ膜電位変化に対してほぼ線形に応答する漏れ電流のみが観測される.

こうした膜電流応答を構成するイオン電流には, 膜電位依存性電流であるカルシウム電流 (I_{Ca}), カリウム電流 (I_{Kv}), 一価のカチオンを透過させ過分極活性型の内向き電流 (I_{h}) と, Ca^{2+} 依存性電流であるカルシウム依存性カリウム電流 ($I_{\text{K}(\text{Ca})}$), Ca^{2+} 依存性塩素電流 ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) が存在する. これらの電流以外にも, 漏れ電流 (I_{l}) や水平細胞から放出される GABA を受容して活性化する GABA 感受性塩素電流 ($I_{\text{Cl}(\text{GABA})}$) が存在するが, 本研究では単離した視細胞を対象とするため, $I_{\text{Cl}(\text{GABA})}$ については考慮に入れていない. 表 3.1 は, これらの各イオン電流の透過イオン, 反転電位, 阻害剤をまとめたものである.

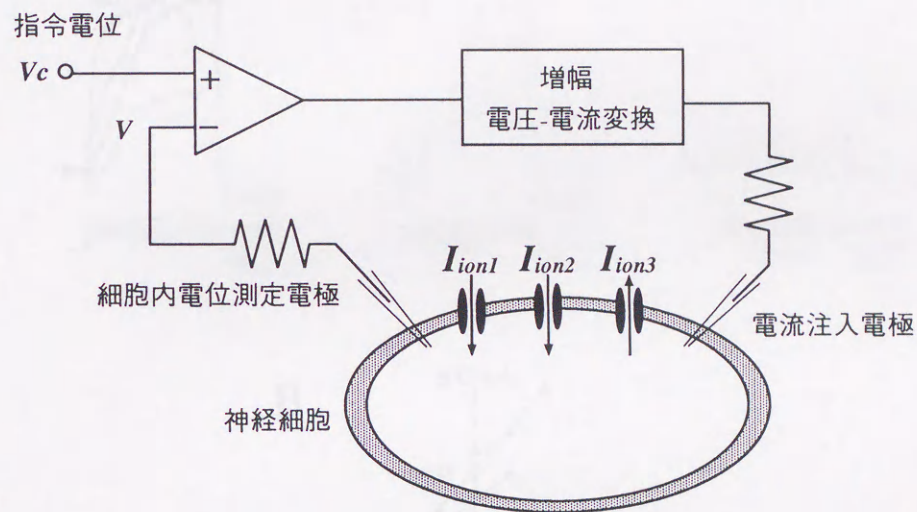


図 3.1 膜電位固定実験の概念図

指令電位 V_c と細胞内電位測定電極の電位 V との差が 0 となるように、電流注入電極から神経細胞へ電流が注入される。この時測定される電流は、各イオン電流の総和となる。任意の値に指令電位を固定することにより、その膜電位におけるイオン電流の時間特性や膜電位特性を測定することが可能となる。

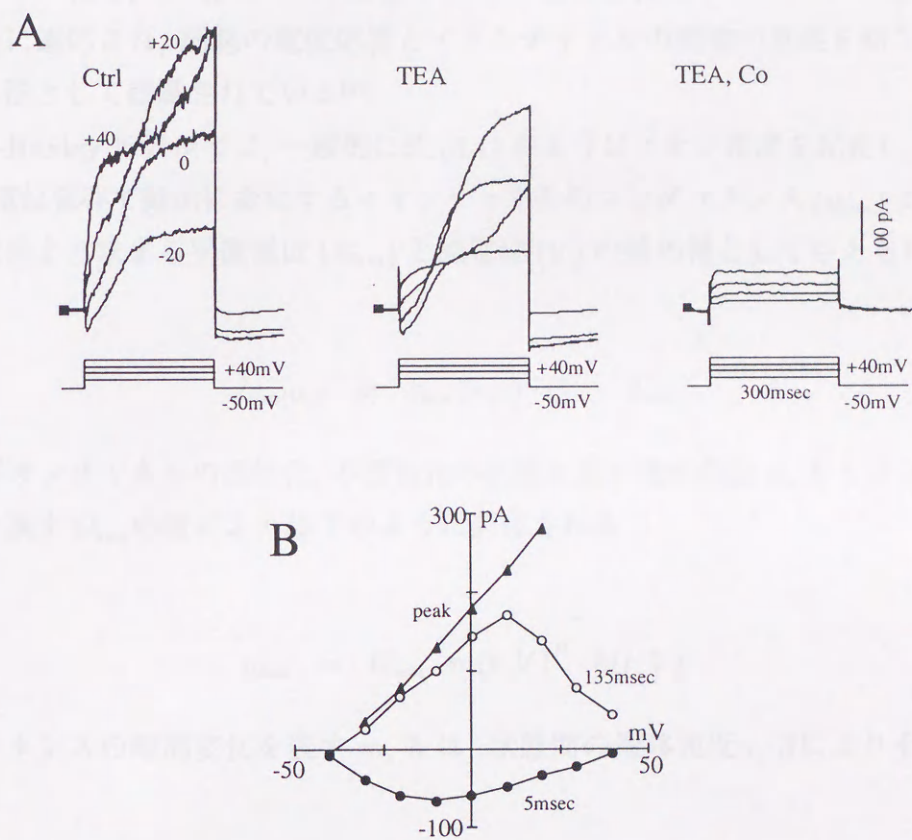


図 3.2 錐体内節の膜電位固定実験^[24]

トカゲ視細胞内節を用いた膜電流応答, A: 通常溶液 (Ctrl), TEA 混入時, TEA と Co 混入時の各溶液における膜電流応答, 固定電位は, -20, 0, 20, 40mV, 固定時間は 300msec
 B: TEA 混入時の膜電流-膜電位特性, 測定時刻は 5msec, 135msec, peak.

3.3 視細胞内節のモデル化

単離した錐体内節には, I_{Ca} , $I_{Cl(Ca)}$, I_{Kv} , $I_{K(Ca)}$, I_l , I_h の6種類のイオン電流が存在する. こうしたイオン電流の特性は, 選択的にイオンを流入, 流出させる各イオンチャネルの特性に依存する. イオンチャネルは, 膜電位変化に従い開閉確率が変化するため, この特性を数理的に記述することにより, イオン電流の特性を再現することが可能となる. こうしたイオン電流のモデル化は, Hodgkin と Huxley による神経興奮機構の解明とその定式化^[26]以降, 様々な細胞に適応され, 細胞の電位応答とイオンチャネルの機能的意義を結び付けるための必須の手法として認識されている^[27].

Hodgkin-Huxley モデルでは, 一般的に式 (3.1) のようにイオン電流を記述し, イオン電流の値は, 膜電位依存で動的に変化するイオンチャネルのコンダクタンス (g_{ion}) と細胞内外のイオン濃度差より求まる平衡電位 (E_{ion}) と膜電位 (V) の差の積として与えられる.

$$I_{ion(V,t)} = g_{ion}(V,t) \cdot (V - E_{ion}) \quad (3.1)$$

g_{ion} は, イオンチャネルの活性化, 不活性化の状態を表す確率変数 m , h とコンダクタンスの最大値を表す G_{ion} の積により以下のように記述される.

$$g_{ion} = G_{ion} \cdot m(t,V)^P \cdot h(t,V) \quad (3.2)$$

コンダクタンスの時間変化を表す m , h は, 状態間の遷移速度 α , β によりそれぞれ表される.

$$\frac{dm(t,V)}{dt} = \alpha_m(V) \cdot (1 - m(t,V)) - \beta_m(V) \cdot m(t,V) \quad (3.3)$$

$$\frac{dh(t,V)}{dt} = \alpha_h(V) \cdot (1 - h(t,V)) - \beta_h(V) \cdot h(t,V) \quad (3.4)$$

以上より, 各イオン電流モデルは, 平衡電位 E_{ion} , 最大コンダクタンス値 G_{ion} , 速度パラメータ α , β の膜電位依存特性を生理実験結果より定めることで記述される. このようにして神経細胞に存在する全てのイオン電流について同様にモデル化を行ない, これらの各イオン電流の総和, 細胞膜の容量成分 (C) を考慮に入れることで, 膜電位 (V) は式 (3.5) より求めることができる. ここで, I_{inp} は, 細胞外から流入する刺激電流である.

$$C \frac{dV}{dt} = I_{inp} - \sum_{ion} I_{ion} \quad (3.5)$$

上式は、コンダクタンスと起電力を並列に接続した電氣的等価回路として表現することが可能である。図 3.3は、視細胞内節に存在するイオン電流の電氣的等価回路である。

膜電位依存性電流に関しては、Hodgkin-Huxley 型の手法によりモデル化が可能であるが、 Ca^{2+} 依存性電流は、細胞内の Ca^{2+} 濃度変化に対して動的にイオン電流特性が変化するため、 Ca^{2+} 電流に起因する Ca^{2+} 濃度変化を求める必要がある。そこで、本論文で提案する内節モデルでは、生理学的知見に基づいた細胞内 Ca^{2+} 機構のモデル化を行った。以下では、視細胞内節における各イオン電流の特性とそのモデル記述を示す。

表 3.1 各イオン電流の特性^[25, 28]

電流	イオン	反転電位 [mV]	阻害剤
I_h	Na^+, K^+	-32	Cs
I_{Kv}	K^+	-80	TEA
$I_{K(Ca)}$	K^+	-80	Co EGTA BAPTA
I_{Ca}	Ca^{2+}	100~130	Co
$I_{Cl(Ca)}$	Cl^-	-40~-55	Co EGTA BAPTA NFA
$I_{Cl(GABA)}$	Cl^-	-40~-55	Picrotoxin Bicuculline

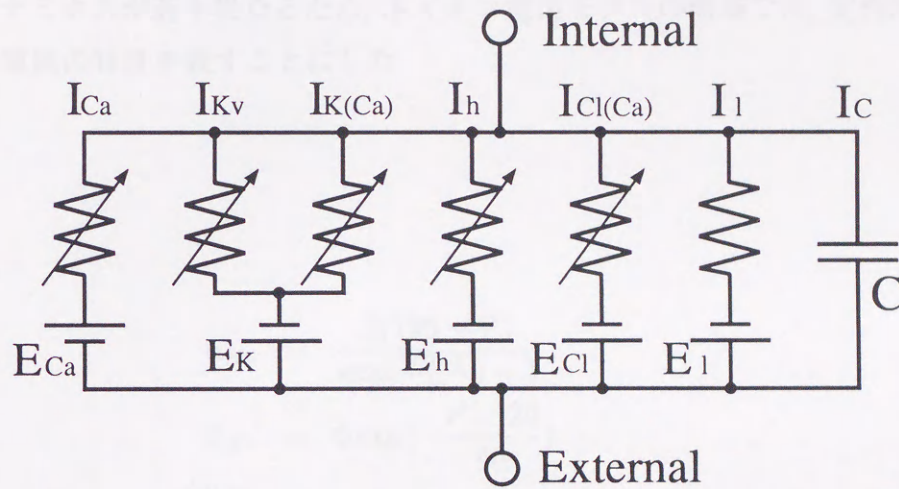


図 3.3 錐体内節のイオン電流モデル

I_{Ca} : Ca^{2+} 電流, I_{Kv} : 膜電位依存性カリウム電流, I_h : 過分極活性型内向き電流, $I_{K(Ca)}$: Ca^{2+} 依存性カリウム電流, $I_{Cl(Ca)}$: Ca^{2+} 依存性塩素電流, I_l : 漏れ電流, C: 膜容量.

3.3.1 膜電位依存性カリウム電流 (I_{Kv})

膜電位依存性カリウム電流 (I_{Kv}) は, 静止膜電位よりも脱分極側で活性化し, 時間経過に従い不活性化する. 図 3.4-A は, 細胞外の K^+ 濃度を 4mM とし, Co^{2+} と Cs^+ を加えて I_{Kv} と I_l 以外の電流をブロックした時の膜電流応答波形と I-V 特性である^[29]. 保持電位は -50mV であり, -40mV から 40mV まで 10mV 刻みに膜電位を 275msec 間固定している. この実験データに適合するよう, モデルの活性化定数, 不活性化定数などの各パラメータの調節を行ない, 式 (3.6)~(3.12) のように記述した. 図 3.4-B は, このモデルによる膜電位固定時の膜電流応答と I-V 特性を示す. この図から, モデル応答が生理実験の結果を定性的に表現していることが確認できる. 実際の生理実験では, 同じ種類の細胞であっても個体によりピーク電流やダイナミクスが若干異なるため, 本イオン電流モデルの構築では, 定性的な一致により各イオン電流の特性を表すことにした.

$$\alpha_{Kv} = \frac{5(100 - V)}{\exp\left(\frac{100 - V}{42}\right) - 1} \quad (3.6)$$

$$\beta_{Kv} = 9 \exp\left(-\frac{V - 20}{40}\right) \quad (3.7)$$

$$\frac{dm_{Kv}}{dt} = \alpha_{Kv} \cdot (1 - m_{Kv}) - \beta_{Kv} \cdot m_{Kv} \quad (3.8)$$

$$\alpha_{Kh} = 0.15 \exp\left(-\frac{V}{22}\right) \quad (3.9)$$

$$\beta_{Kh} = \frac{0.4125}{\exp\left(\frac{10 - V}{7}\right) + 1} \quad (3.10)$$

$$\frac{dm_{Kh}}{dt} = \alpha_{Kh} \cdot (1 - m_{Kh}) - \beta_{Kh} \cdot m_{Kh} \quad (3.11)$$

$$I_{Kv} = \bar{g}_{Kv} \cdot (m_{Kv})^3 \cdot m_{Kh} \cdot (V - E_K) \quad (3.12)$$

\bar{g}_{Kv} : Kv チャネルの最大コンダクタンス, 2.0[nS]

E_K : I_{Kv} の反転電位 -80[mV]

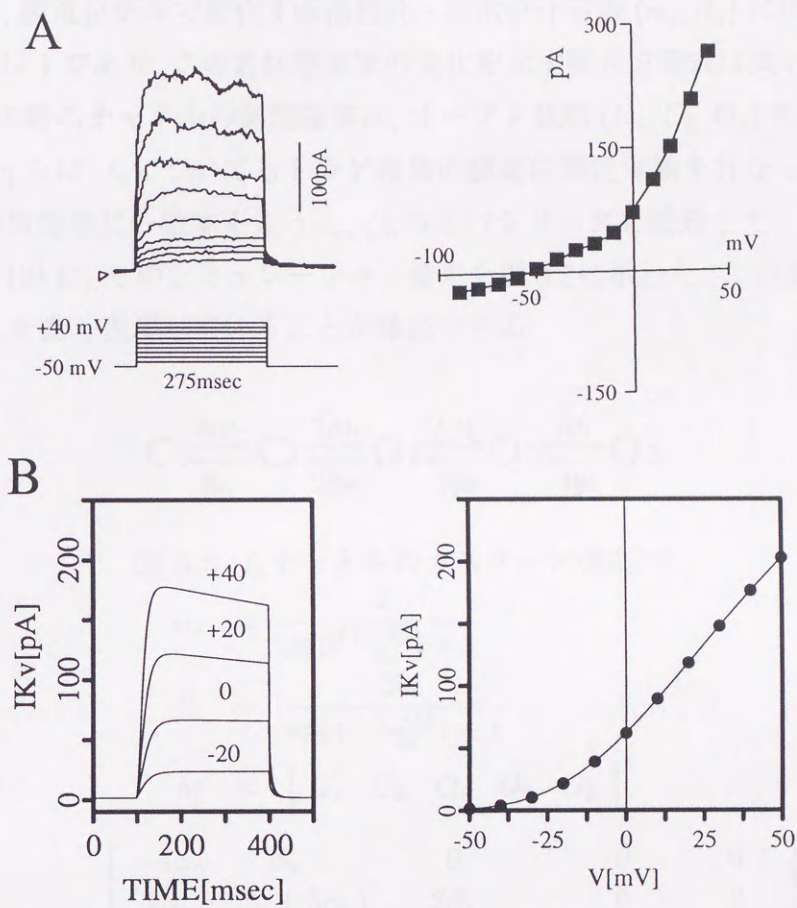


図 3.4 I_{Kv} の時間特性と I-V 特性

A: トカゲ錐体内節の膜電位固定実験による I_{Kv} の特性. 固定電位は $-40 \sim +40$ mV まで 10 mV 刻みとし, 固定時間は 275 msec である^[29]. 細胞外のカリウムイオン濃度は 4 mM. B: モデルによる膜電位固定時の時間特性と I-V 特性.

3.3.2 過分極活性型内向き電流 (I_h)

過分極活性型内向き電流 (I_h) は、反転電位が約 -32mV であり、静止膜電位より過分極側で活性化する。活性化の速度は比較的遅く不活性化は見られない。 I_h について Barnes ら^[19]は、2つのクローズ状態 (C_1, C_2) と3つのオープン状態 (O_1, O_2, O_3) を持つカスケードモデル (図 3.5) を提案しており、本モデルにおいてもこのモデル構造を用いた。このモデルの各状態の確率は、膜電位依存で変化する活性化・不活性化定数 (α_h, β_h) に従い推移する。各状態確率の総和は1であり、この各状態確率の変化を示す微分方程式は式 (3.13)~(3.17) で記述される。この時のチャネルの開閉確率は、オープン状態 (O_1, O_2, O_3) の総和となる (式 (3.18))。Maricq らは、 I_h についてもトカゲ錐体の膜電位固定実験を行っており (図 3.6)、この各電位の時間特性に一致するよう α_h, β_h の各パラメータを設定した。このモデル記述を式 (3.13)~(3.19) に、そのシミュレーション結果を図 3.7に示した。この結果から、このモデルが実際の I_h を良く表現していることが確認できる。

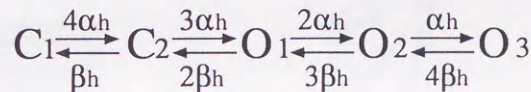


図 3.5 I_h チャネルのカスケード構造^[19]

$$\alpha_h = \frac{3}{\exp\left(\frac{V+88}{14}\right) + 1} \quad (3.13)$$

$$\beta_h = \frac{20}{\exp\left(-\frac{V+18}{20}\right) + 1} \quad (3.14)$$

$$M = [C_1 \ C_2 \ O_1 \ O_2 \ O_3]^t \quad (3.15)$$

$$K = \begin{bmatrix} -4\alpha_h & \beta_h & 0 & 0 & 0 \\ 4\alpha_h - (\beta_h + 3\alpha_h) & 2\beta_h & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 3\alpha_h & -(2\beta_h + 2\alpha_h) & 3\beta_h & 0 \\ 0 & 0 & 3\alpha_h & -(3\beta_h + \alpha_h) & 4\beta_h \\ 0 & 0 & 0 & \alpha_h & -4\beta_h \end{bmatrix} \quad (3.16)$$

$$\frac{d}{dt}M = KM \quad (3.17)$$

$$m_h = O_1 + O_2 + O_3 \quad (3.18)$$

$$I_h = \bar{g}_h \cdot m_h \cdot (V - E_h) \quad (3.19)$$

\bar{g}_h : I_h チャネルの最大コンダクタンス, $0.305[\text{nS}]$

E_h : I_h の反転電位 $-32[\text{mV}]$

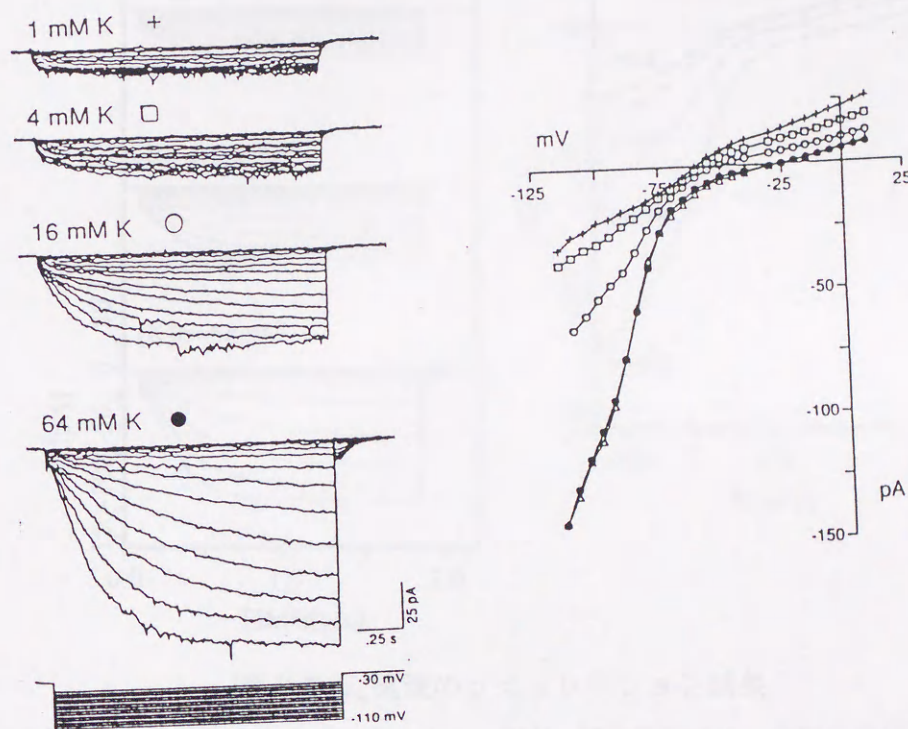


図 3.6 I_h 電流の生理実験結果 [30]

細胞外のカリウムイオン濃度を变化させた時の I_h の特性, 濃度変化は 1, 4, 16, 64mM であり, 浸透圧が等しくなるようにナトリウムイオンと交換した. 固定電位は, 時間特性が $-110 \sim -40\text{mV}$ まで 10mV 刻み, IV 特性が $-110 \sim +10\text{mV}$ まで 5mV 刻みである. 膜電位固定時間は 1.75sec .

3.3.3 I_h 電流 (1)

I_h 電流 (1) は、 -100 mV から -50 mV までを掃引して、 I_h 電流の特性を調べた。図 3.7 は、細胞外のカリウムイオン濃度を 1 mM, 4 mM, 16 mM, 64 mM と変化させたときの I_h 電流のシミュレーション結果を示している。図 3.7 の左側のグラフは、 I_h 電流の時間経過を示している。右側のグラフは、 I_h 電流の電圧依存性を示している。

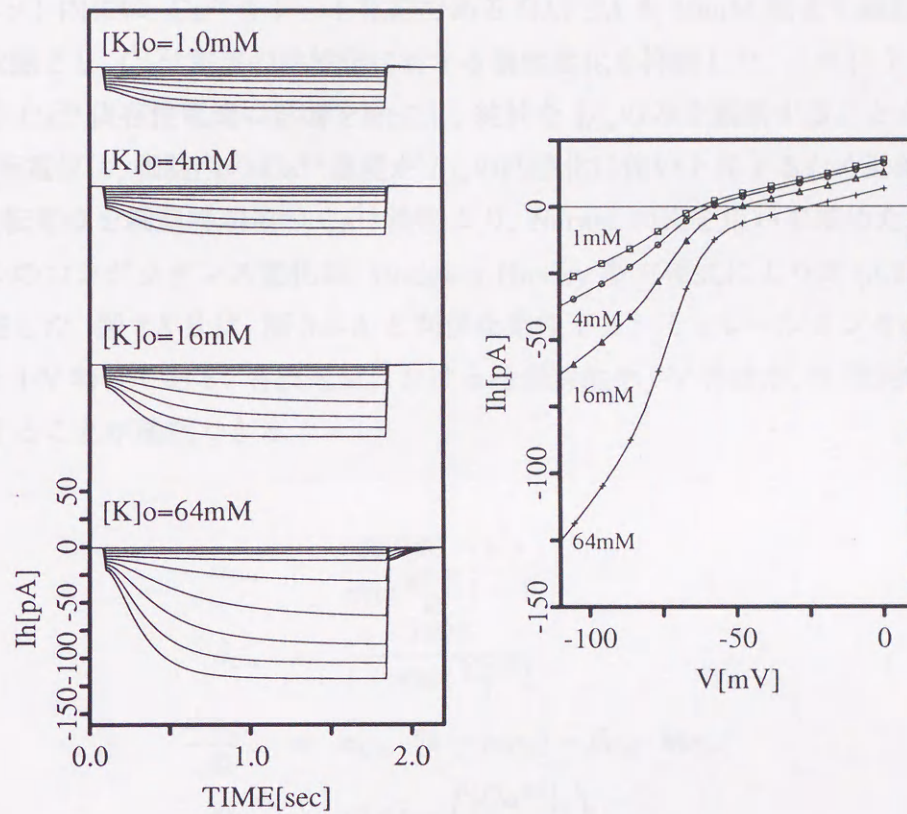


図 3.7 I_h 電流のシミュレーション結果

図 3.6 と同様な条件によるシミュレーション結果。細胞外のカリウムイオン濃度を変化させると、 I_h や漏れ電流のコンダクタンス成分や反転電位が変化するため、各カリウムイオン濃度により以下のようにパラメータを変更した (1mM: $g_h=0.227$, $E_h=-38$, $E_l=-70.53$, 4mM: $g_h=0.305$, $E_h=-32.8$, $E_l=-65.1$, 16mM: $g_h=0.548$, $E_h=-28.1$, $E_l=-52.02$, 64mM: $g_h=1.077$, $E_h=-18.75$, $E_l=27.0$)。

3.3.3 Ca^{2+} 電流 (I_{Ca})

Ca^{2+} 電流 (I_{Ca}) は、約 -40mV 以上の脱分極側で活性化し、約 0mV で最大、それより脱分極側で減少するベル型のI-V特性を示す。この電流は活性化が速く、約 10msec で定常状態となる。図3.8-Aは、Maricqらが測定したトカゲ錐体内節の I_{Ca} である。実験条件は、細胞外溶液のカルシウム濃度を 10mM とし、TEAと Cs^+ を加えて I_{Ca} 以外をブロックした。さらに、ピペット内には、 Ca^{2+} キレート化剤であるBAPTAを 10mM 加えて細胞内の Ca^{2+} 濃度を低い状態とし、 Ca^{2+} 電流の活性化に対する濃度変化を抑制した。これにより、 Ca^{2+} 濃度変化に伴う Ca^{2+} 依存性電流の影響を除去し、純粋な I_{Ca} のみを観測することができる。

I_{Ca} の反転電位は、細胞内の Ca^{2+} 濃度が I_{Ca} の活性化に伴い上昇するため動的に変化する。そこで、反転電位を細胞膜周辺の Ca^{2+} 濃度より、Nernstの式を用いて求めた。膜電位依存性チャンネルのコンダクタンス変化は、Hodgkin-Huxley型方程式により式(3.20)~(3.25)のように記述した。図3.8-Bは、図3.8-Aと同様な条件下でシミュレーションを行った時の膜電流応答とI-V特性である。各膜電位における時間特性やI-V特性が、生理実験結果と定性的に一致することが確認できる。

$$\alpha_{Ca} = \frac{300(80 - V)}{\exp\left(\frac{80 - V}{25}\right) - 1} \quad (3.20)$$

$$\beta_{Ca} = \frac{1000}{1 + \exp\left(\frac{V + 38}{7}\right)} \quad (3.21)$$

$$\frac{dm_{Ca}}{dt} = \alpha_{Ca} \cdot (1 - m_{Ca}) - \beta_{Ca} \cdot m_{Ca} \quad (3.22)$$

$$E_{Ca} = 12.9 \log \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]_o}{[\text{Ca}^{2+}]_s} \right) \quad (3.23)$$

$$m_{Cah} = \frac{\exp\left(\frac{40 - V}{18}\right)}{1 + \exp\left(\frac{40 - V}{18}\right)} \quad (3.24)$$

$$I_{Ca} = \bar{g}_{Ca} \cdot (m_{Ca})^4 \cdot m_{Cah} \cdot (V - E_{Ca}) \quad (3.25)$$

- m_{Ca} : Ca^{2+} チャンネルの開閉確率
- $[\text{Ca}^{2+}]_o$: 細胞外の Ca^{2+} 濃度, $10[\text{mM}]$
- $[\text{Ca}^{2+}]_s$: 細胞膜周辺の Ca^{2+} 濃度
- \bar{g}_{Ca} : Ca^{2+} チャンネルの最大コンダクタンス, $1.2[\text{nS}]$

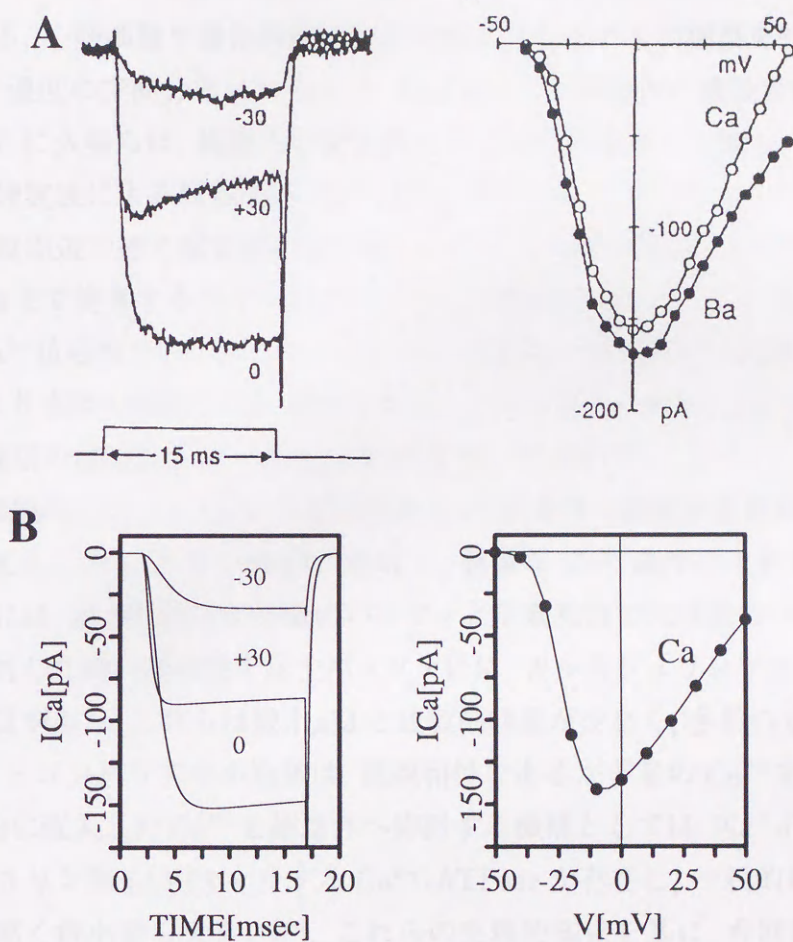


図 3.8 I_{Ca} の時間特性と I-V 特性

A: トカゲ錐体内節の Ca^{2+} 電流. 左図は細胞外の Ca^{2+} 濃度を 10mM とした時の膜電流応答^[24]. 右図は電流-電圧特性. B: A に対応するシミュレーション結果, 細胞外の Ca^{2+} 濃度は 10mM.

3.3.4 細胞内 Ca^{2+} 機構のモデル記述

細胞内の Ca^{2+} は、 K^+ チャンネルや Cl^- チャンネルの特性に影響を及ぼすと共に細胞内情報伝達機構に対するセカンドメッセンジャーとして機能することが知られている。そのため最近では Ca^{2+} 感受性色素を用いた実験やその結果に基づくモデル記述が様々な神経細胞について行なわれている^{[31][32]}。しかし、錐体内節の Ca^{2+} 濃度変化を測定した生理実験データやこれに基づくモデルなどは、構築されていない。このため、細胞内 Ca^{2+} 機構について最も研究が進んでいる、心筋細胞や錐体外節の知見を取り入れモデルの構築を行った。

細胞内 Ca^{2+} 濃度の空間分布については、Yamada らが細胞内の離散分割モデルを提案している^[33]。さらに久場らは、細胞内を細胞膜直下と細胞質深部に分割したモデルを構築し、その結果が生理実験による細胞内の Ca^{2+} 濃度変化と対応すること示した^[34]。これは、濃度の上昇が細胞膜周辺で速く細胞質深部で遅いという生理学的知見に基づいて提案されたものであり、本論文で提案するモデルにおいてもこの構造を導入した。これにより、細胞膜上に存在する Ca^{2+} 依存性チャンネルのコンダクタンス変化を細胞膜周辺の濃度を用いて求めることができ、より実際の細胞に近い特性を得ることができる。さらに、 I_{Ca} の反転電位についても、細胞膜周辺の濃度変化より Nernst の式を用いて求めた。

さて、神経細胞内には、バッファと呼ばれる Ca^{2+} 吸着性の物質が多数存在する。バッファは、細胞内に流入した Ca^{2+} を一時的に吸収し、急激な Ca^{2+} 濃度の上昇を防ぐ働きがある^{[14][32]}。細胞内には、高親和性で小容量のバッファと低親和性で大容量のバッファの2種類がある。 Ca^{2+} に対して高い親和性を示すバッファには、カルモジュリンやカルシニューリンなどのタンパク質があり、これらは数十 μM と比較的容量が少なく、多数の Ca^{2+} 結合部位を有する。また、ミトコンドリアや小胞体は、低親和性であるが多量の Ca^{2+} を貯蔵できる^{[34][35]}。

一方、細胞内に流入した Ca^{2+} を細胞外へ排出する機構としては、 Na^+ - Ca^{2+} 、 K^+ 交換機構とアデノシン3リン酸 (ATP) を介する Ca^{2+} -ATPase が存在し、一般的に Ca^+ -ATPase の方が親和性が高く排出量も大きい^[35]。これらの生理的知見を基に、今回提案するモデルには、特性の違う2種類のバッファと2種類の Ca^{2+} 排出機構を導入した。以上の Ca^{2+} 機構のモデル記述を表3.2に、その概念図を図3.9に示す。

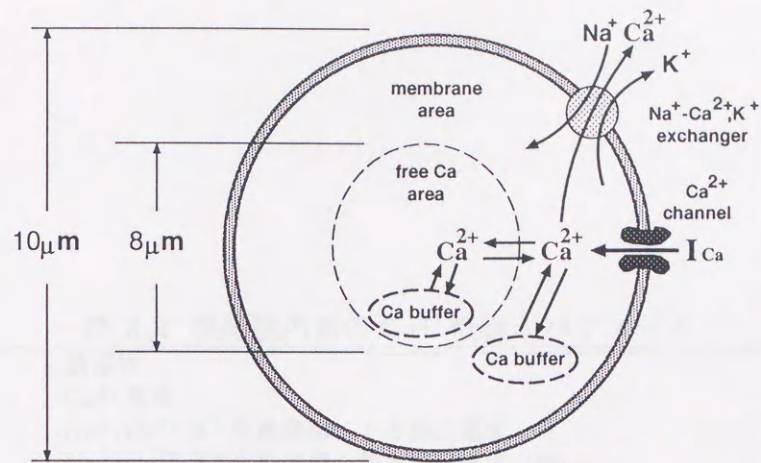


図 3.9 細胞内の Ca^{2+} 機構の概念図

細胞内を細胞内領域と細胞膜周辺領域の 2 つに分割し、それぞれの Ca^{2+} 濃度変化を求めている。細胞内の Ca^{2+} 調節機構には、細胞内の Ca^{2+} を細胞外へ排出する Na^+-Ca^{2+},K^+ 交換機構・ Ca^{2+} -ATPase と Ca^{2+} を一時的に貯蔵する Ca^{2+} バッファが存在する。

表 3.2 視細胞内節の Ca^{2+} 機構のモデル記述

calcium concentration	
$\frac{d}{dt}[Ca^{2+}]_s$	$= -\frac{I_{Ca}}{2FV_1} - \frac{I_{ex} + I_{ex2}}{2FV_1} - D_{Ca} \frac{S_1}{V_1\delta} ([Ca^{2+}]_s - [Ca^{2+}]_f) + Lb_2[Ca^{2+}]_{ls}$ $- Lb_1[Ca^{2+}]_s(BL - [Ca^{2+}]_{ls}) - Hb_1[Ca^{2+}]_s(BH - [Ca^{2+}]_{hs}) + Hb_2[Ca^{2+}]_{hs}$
$\frac{d}{dt}[Ca^{2+}]_f$	$= D_{Ca} \frac{S_1}{V_2\delta} ([Ca^{2+}]_s - [Ca^{2+}]_f) + Lb_2[Ca^{2+}]_{lf} - Lb_1[Ca^{2+}]_f(BL - [Ca^{2+}]_{lf})$ $- Hb_1[Ca^{2+}]_f(BH - [Ca^{2+}]_{hf}) + Hb_2[Ca^{2+}]_{hf}$
calcium buffer concentration	
$\frac{d}{dt}[Ca^{2+}]_{ls}$	$= Lb_1[Ca^{2+}]_s(BL - [Ca^{2+}]_{ls}) - Lb_2[Ca^{2+}]_{ls}$
$\frac{d}{dt}[Ca^{2+}]_{hs}$	$= Hb_1[Ca^{2+}]_s(BH - [Ca^{2+}]_{hs}) - Hb_2[Ca^{2+}]_{hs}$
$\frac{d}{dt}[Ca^{2+}]_{lf}$	$= Lb_1[Ca^{2+}]_f(BL - [Ca^{2+}]_{lf}) - Lb_2[Ca^{2+}]_{lf}$
$\frac{d}{dt}[Ca^{2+}]_{hf}$	$= Hb_1[Ca^{2+}]_f(BH - [Ca^{2+}]_{hf}) - Hb_2[Ca^{2+}]_{hf}$
calcium extrusion mechanisms	
I_{ex}	$= I_{max} \cdot \exp\left(-\frac{V + 14}{70}\right) \cdot \frac{([Ca^{2+}]_s - Ca_e)}{([Ca^{2+}]_s - Ca_e) + 2.3}$
I_{ex2}	$= I_{max2} \cdot \frac{([Ca^{2+}]_s - Ca_e)}{([Ca^{2+}]_s - Ca_e) + 0.5}$

表 3.3 視細胞内節の Ca^{2+} 機構のパラメータ

V	膜電位
I_{Ca}	Ca^{2+} 電流
I_{ex}	Na^+ - Ca^{2+} , K^+ 交換機構による排出電流
I_{max}	Na^+ - Ca^{2+} , K^+ 交換機構の最大排出電流, 20[pA]
I_{ex2}	Ca^{2+} ATPase による排出電流
I_{max2}	Ca^{2+} ATPase の最大排出電流, 30[pA]
F	ファラデー定数
$[\text{Ca}^{2+}]_s$	細胞膜領域の Ca^{2+} 濃度
$[\text{Ca}^{2+}]_f$	細胞内領域の Ca^{2+} 濃度
$[\text{Ca}^{2+}]_{hs}$	細胞膜領域の高親和バッファの Ca^{2+} 吸収基質濃度
$[\text{Ca}^{2+}]_{ls}$	細胞膜領域の低親和バッファの Ca^{2+} 吸収基質濃度
$[\text{Ca}^{2+}]_{hf}$	細胞内領域の高親和バッファの Ca^{2+} 吸収基質濃度
$[\text{Ca}^{2+}]_{lf}$	細胞内領域の低親和バッファの Ca^{2+} 吸収基質濃度
BH	高親和性バッファの最大基質濃度, 500[μM]
BL	低親和性バッファの最大基質濃度, 300[μM]
Lb_1	細胞内から低親和性バッファへの Ca^{2+} の流入速度, 0.4[$\text{sec}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]
Lb_2	低親和性バッファから細胞内への Ca^{2+} の流入速度, 0.2[sec^{-1}]
Hb_1	細胞内から高親和性バッファへの Ca^{2+} の流入速度, 100[$\text{sec}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]
Hb_2	高親和性バッファから細胞内への Ca^{2+} の流入速度, 90[sec^{-1}]
V_1	細胞膜領域の容量, 3.812×10^{-13} [ℓ]
V_2	細胞内領域の容量, 5.236×10^{-13} [ℓ]
S_2	細胞膜領域の表面積, 3.142×10^{-6} [cm^2]
D_{Ca}	Ca^{2+} の拡散定数, 6.0×10^{-6} [cm^2/sec]
δ	拡散距離, 3×10^{-4} [cm]
Ca_e	Ca^{2+} ポンプの最小排出濃度, 0.05[μM]

3.3.5 Ca^{2+} 依存性塩素電流 ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$)

Ca^{2+} 依存性塩素電流 ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) は、細胞内の Ca^{2+} 濃度に従い変化するため、この電流のモデル化には細胞内の Ca^{2+} 濃度を考慮に入れる必要がある^{[24][32]}。そこで、細胞膜周辺の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_s$) 変化に対して、Cl チャネルの開閉確率がシグモイド関数状に変化すると仮定しモデル化を行った。

$$m_{\text{Cl}} = \frac{1}{1 + \exp((Cl_h - [\text{Ca}^{2+}]_s)/0.09)} \quad (3.26)$$

$$I_{\text{Cl}(\text{Ca})} = \bar{g}_{\text{Cl}} \cdot m_{\text{Cl}} \cdot (V - E_{\text{Cl}}) \quad (3.27)$$

- \bar{g}_{Cl} : $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ チャネルの最大コンダクタンス, 6.5[nS]
 E_{Cl} : $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ の反転電位, -45[mV]
 Cl_h : $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ の開閉確率が0.5となる Ca^{2+} 濃度, 0.37[μM]
 $[\text{Ca}^{2+}]_s$: 細胞膜表面の Ca^{2+} 濃度

3.3.6 Ca^{2+} 依存性カリウム電流 ($I_{\text{K}(\text{Ca})}$)

錐体内節における $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ の存在は、Maricq らの論文では明確に示されていない。しかし、杆体内節では、この電流の存在が確認されていることや^[25]、錐体内節においても、TEA 混入時と Ctrl 時の膜電位固定後の電流の差および Ca スパイク終了後の膜電位の値などを考えると存在する可能性が高い。

この電流は、一般的に膜電位と Ca^{2+} 濃度に依存し変化するため、Hodgkin-Huxley 型の膜電位依存の式と Michaelis-Menten 型の Ca^{2+} 依存の式の積として記述した。その記述を以下に示す。

$$\alpha_{\text{Kc}} = \frac{15(80 - V)}{\exp(\frac{80-V}{40}) - 1} \quad (3.28)$$

$$\beta_{\text{Kc}} = 20 \exp(-\frac{V}{35}) \quad (3.29)$$

$$\frac{dm_{\text{Kc}}}{dt} = \alpha_{\text{Kc}}(1 - m_{\text{Kc}}) - \beta_{\text{Kc}} \cdot m_{\text{Kc}} \quad (3.30)$$

$$m_{\text{Kc1}} = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_s}{[\text{Ca}^{2+}]_s + 0.3} \quad (3.31)$$

$$I_{\text{K}(\text{Ca})} = \bar{g}_{\text{Kc}} \cdot (m_{\text{Kc}})^2 \cdot m_{\text{Kc1}} \cdot (V - E_{\text{K}}) \quad (3.32)$$

- m_{Kc} : 膜電位依存の $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ チャネルの開閉確率
 m_{Kc1} : Ca^{2+} 依存の開閉確率
 \bar{g}_{Kc} : Kc チャネルの最大コンダクタンス, 0.5[nS]

3.3.7 漏れ電流 (I_l)

漏れ電流は, TEA, Co^{2+} を加えて, 全てのチャネルをブロックした時に観測される電流である. この電流は, イオンが細胞膜を浸透するため生じると考えられている. 漏れ電流については, 図 3.4 の TEA · Co^{2+} 混入時の膜電流応答より, 膜電位変化に対して電流が比例すると仮定し, 以下の式で記述した.

$$I_l = \bar{g}_l \cdot (V - E_l) \quad (3.33)$$

\bar{g}_l : 漏れ電流のコンダクタンス 0.5[nS]

E_l : 漏れ電流の反転電位 -55[mV]

3.4 膜電位固定のシミュレーション

錐体内節のイオン電流モデルは, 図 3.3 の電氣的等価回路で表現できる. この回路から膜電位 V は, 各イオン電流の総和と刺激電流, 膜容量により求まる (式 (3.34)). 膜容量 C は, Maricq らの測定結果から 10pF とした^[24].

$$C \frac{dV}{dt} = I - (I_{Ca} + I_{Kv} + I_h + I_{Cl(Ca)} + I_{K(Ca)} + I_l) \quad (3.34)$$

膜電位固定実験は, 膜電位がある特定の電位となるように刺激電流 I を調節するものであり, この時に観測されている電流変化は, $\frac{dV}{dt} = 0$ であるため各イオン電流の総和となる (式 (3.35)). 従って, 膜電位固定のシミュレーションは, 阻害剤などによりブロックされた電流を取り除き, 膜を透過するイオン電流のみを加算することで求まる.

$$I = I_{Ca} + I_{Kv} + I_h + I_{Cl(Ca)} + I_{K(Ca)} + I_l \quad (3.35)$$

図 3.10-A は, 膜電位固定実験のシミュレーション結果であり, 図 3.11 はコントロール時の各イオン電流の時間応答特性である. 各溶液におけるシミュレーション条件は, 図 3.4 の生理実験と対応させるため, コントロール時で全イオン電流の和, TEA 混入時では I_{Kv} がブロックされるため I_{Kv} を通常の 8% まで低下させた. 同様に, TEA と Co^{2+} 混入においても, これらの阻害剤でブロックされない漏れ電流と I_{Kv} を通常の 8% 流した. なお, 図 3.4 の実験では, Cs^+ を全溶液で加えており, 本シミュレーションにおいても全溶液で I_h を除去して行

なった。また、細胞外の Ca^{2+} 濃度は生理実験に対応させ 5mM とし、 I_{Ca} のコンダクタンスは Ca^{2+} 濃度の低下に対応させて 0.7nS とした。

このシミュレーション結果から、コントロール時の膜電流応答は、-20mV において膜電位固定から約 30msec 間に活性化の速い I_{Ca} による内向き電流が観測される。その後、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇に従って Ca^{2+} 依存性電流 ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$, $I_{\text{K}(\text{Ca})}$) が活性化し外向き電流が増加する。固定電位が 0 と 20mV では、 I_{Ca} より外向き電流である I_{Kv} や I_{l} が増大するため膜電位固定直後の顕著な内向き電流は観測されないが、時間特性は -20mV 固定時とほぼ同様である。これに対して、40mV 固定時では、 I_{Ca} が減少するため細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が遅く、 $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ が活性化されにくいため固定時間内での膜電流の飽和は見られない。

TEA 混入時では、外向き電流の I_{Kv} がブロックされるため、膜電位固定直後の内向き電流が相対的に大きくなる。さらに、全ての固定電位において外向き電流の減少が確認される。TEA と Co^{2+} を同時に加えた時は、 I_{l} 以外の電流がほぼブロックされるため、膜電流応答は時間的变化を示さない。また、固定電位変化に対してほぼ線形に変化する。

図 3.10-B は、図の生理実験と対応させ、TEA を加えた状態における 5msec、135msec、ピーク時の I-V 特性を求めたものである。5msec 時の I-V 特性では、活性化の速い I_{Ca} が主に流れているため、ほぼ I_{Ca} の I-V 特性に近い形状となる。135msec 時の I-V 特性では、 $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ が活性化するため外向き電流となり、この時の I-V 特性の形は、 I_{Ca} が大きければ $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ も活性化され易いため I_{Ca} の I-V 特性を逆にした山型となる。

以上のシミュレーション結果は、図 3.4 の生理実験の時間特性や I-V 特性をほぼ再現しており、生理学的知見に対する本モデルの妥当性が確認された。

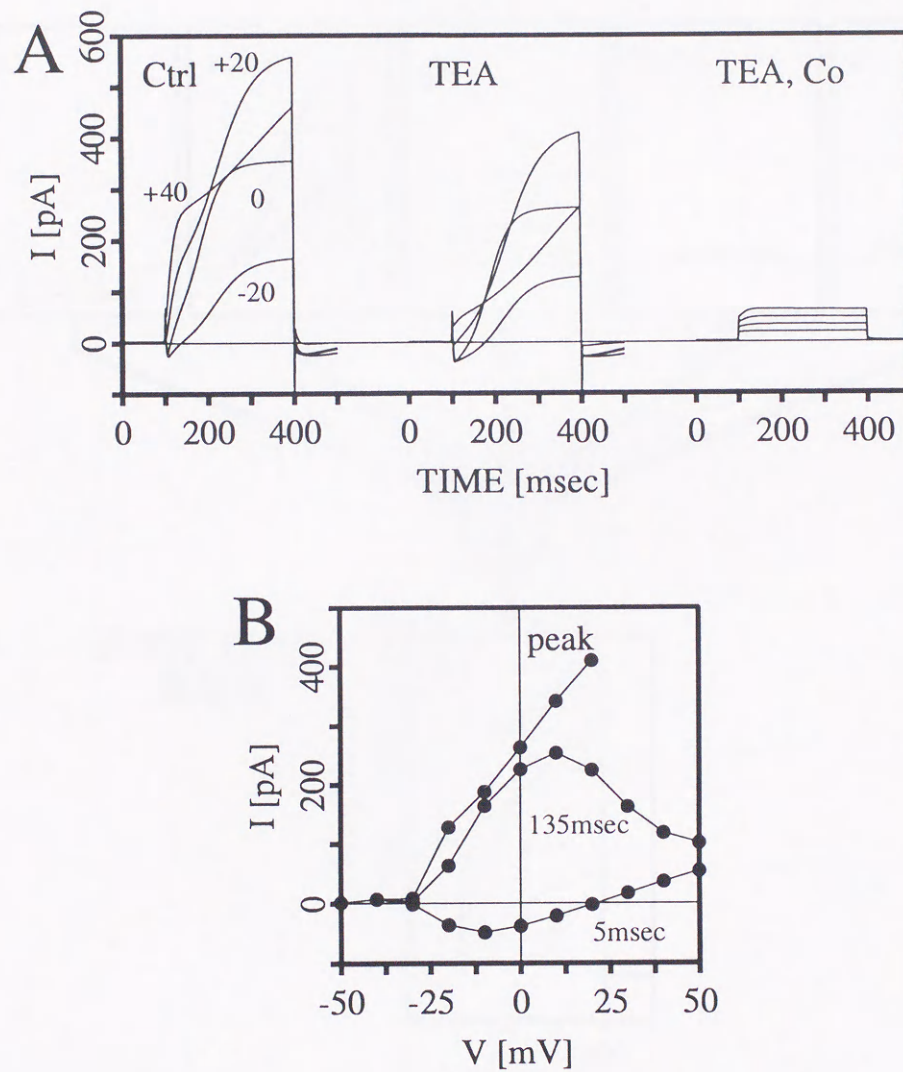


図 3.10 内節モデルの膜電位固定シミュレーション

A:各溶液における膜電位固定時の膜電流応答, 固定電位は, -20, 0, 20, 40mV, 固定時間は 300msec, B:TEA 混入時の I-V 特性 (5msec, 135msec, peak 時のもの).

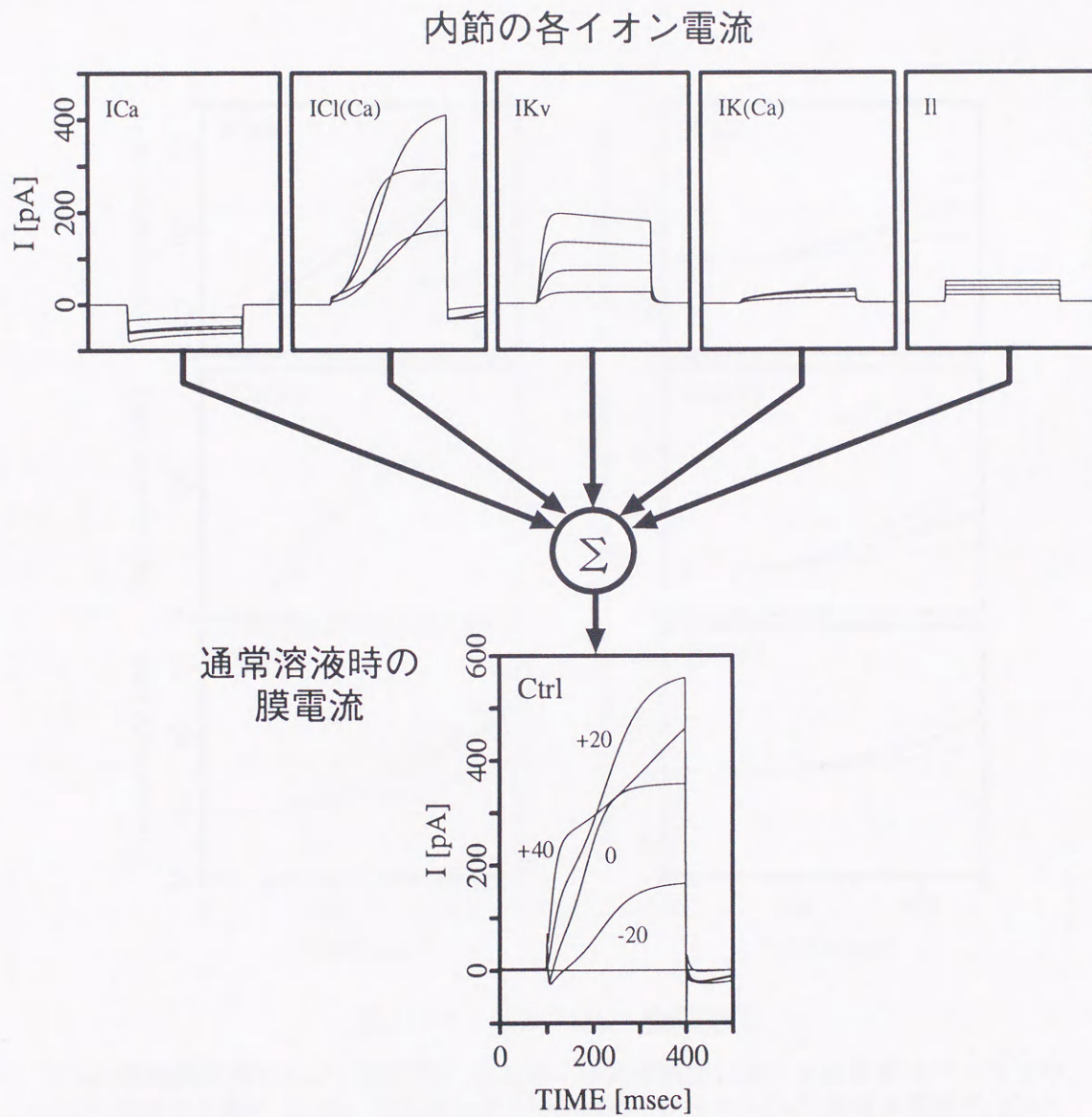


図 3.11 膜電位固定時の内節イオン電流の時間特性

各イオン電流の時間特性の総和が Ctrl 時の膜電流となる。但し, Ctrl 溶液に Cs⁺を加えているため, I_hは阻害されており, このシミュレーションにおいても I_hを取り除いた。

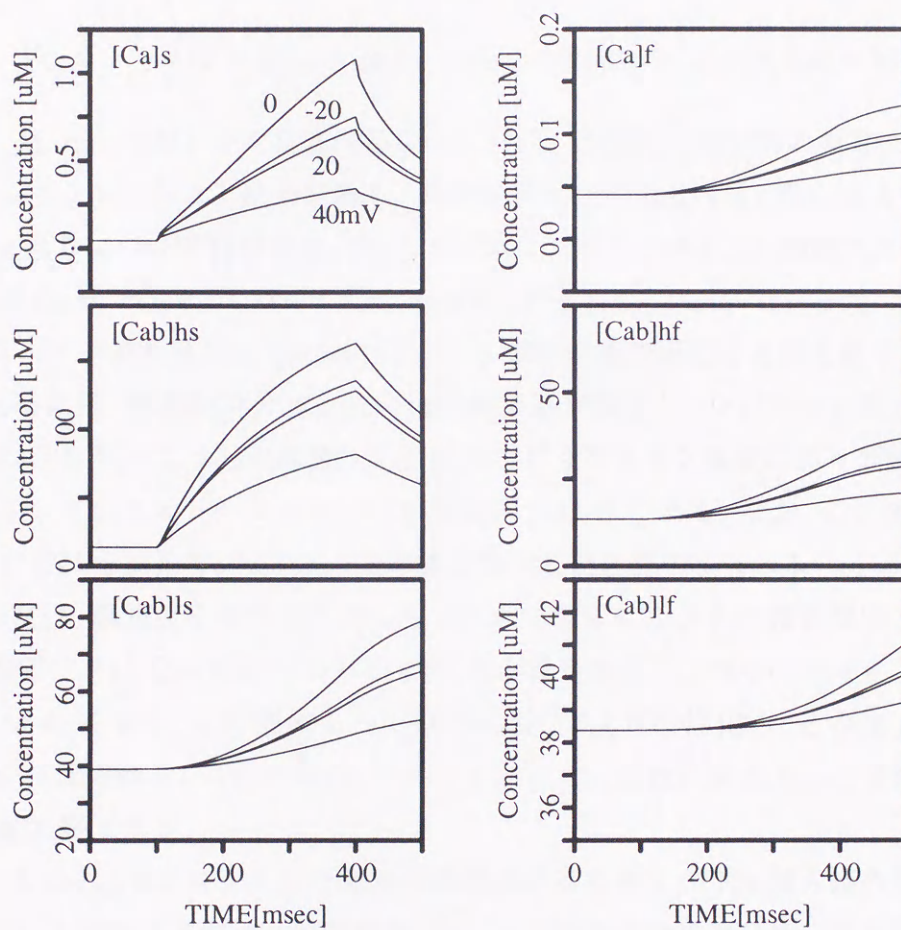


図 3.12 内節の Ca²⁺濃度変化

[Ca]s:細胞膜表面の Ca²⁺濃度変化, [Ca]hs: 細胞膜表面における高吸着性バッファの Ca²⁺吸着基質濃度, [Ca]ls: 細胞膜表面の低吸着性バッファの Ca²⁺吸着基質濃度, [Ca]f: 細胞内部の Ca²⁺濃度変化, [Ca]hf: 細胞内部における高吸着性バッファの Ca²⁺吸着基質濃度, [Ca]ls: 細胞内部の低吸着性バッファの Ca²⁺吸着基質濃度

3.5 膜電流固定のシミュレーション

膜電流固定実験は、膜電流を一定としたときの膜電位応答を測定するものであり、この時の膜電位応答 V は式 (3.34) より以下の式で求まる。なお V_0 は静止膜電位である。

$$V = \frac{1}{C} \int \{I - (I_{Ca} + I_{Kv} + I_{Cl(Ca)} + I_{K(Ca)} + I_h + I_l)\} dt + V_0 \quad (3.36)$$

図 3.13 は、Maricq らがトカゲ錐体内節用いて観測した膜電流固定時の膜電位応答と、それに対応するシミュレーション結果である。通常溶液時の膜電流固定 (図 3.13-A 左) は、10pA と 20pA の 2 通りについて行なわれ、20pA 固定時に Ca^{2+} スパイクが観察された。このピーク電位はほぼ 0mV であり、スパイク発生後の静止膜電位は -45mV であった。カルシウムスパイクは、スパイク発生直後と 70msec 付近の 2 段階の過分極応答を経て終了する。

TEA 混入時には、急激な脱分極直後の過分極応答が消失し、なだらかに静止膜電位に復帰する (図 3.13-A 右)。こうした膜電位応答がどのようなイオン電流により形成されるかを、本モデルを用いてシミュレーションした結果が図 3.13-B である。なお、この生理実験では、細胞外溶液に Cs^+ を加えているため、 I_h 電流は除去した状態でシミュレーションを行った。

図 3.14-B 左は、膜電流をそれぞれ 10pA、20pA に固定したときの膜電位応答を示しており、ほぼ実験データに近い Ca^{2+} スパイクの発生が見られる。この時の各イオン電流の時間特性を図 3.14-A に示す。この図から、 I_{Ca} 活性化後に I_{Kv} が活性化し、その後 $I_{Cl(Ca)}$ が活性化することが観測される。このため Ca^{2+} スパイクは、 I_{Kv} 活性化時と $I_{Cl(Ca)}$ 活性化時の 2 段階の過程を経て終了する。

図 3.14-B 右は I_{Kv} をブロックした場合の膜電位応答であり、TEA 混入時の生理実験結果と同様に、ピーク振幅とスパイク幅の増加、スパイク発生直後の過分極応答の消失が見られる。図 3.14-B は、この時の各イオン電流である。この図から、 I_{Ca} の増加と顕著な応答時間の延長、遅れを伴う $I_{Cl(Ca)}$ の活性化が観測される。このためスパイクは、 I_{Ca} の増加や活性化時間の延長に伴い、スパイク幅やピーク振幅の増加を引き起こす。さらに、スパイク発生直後の過分極応答が I_{Kv} を阻害することにより引き起こされることが確認できる。

以上の結果から、本モデルは、錐体内節の膜電位応答や膜電流応答の特性を十分再現することが確認された。さらに、本モデルを用いることにより、生理実験では測定が不可能な膜電流固定時の各イオン電流の時間特性と、その膜電位応答への関与について調べることが可能となる。

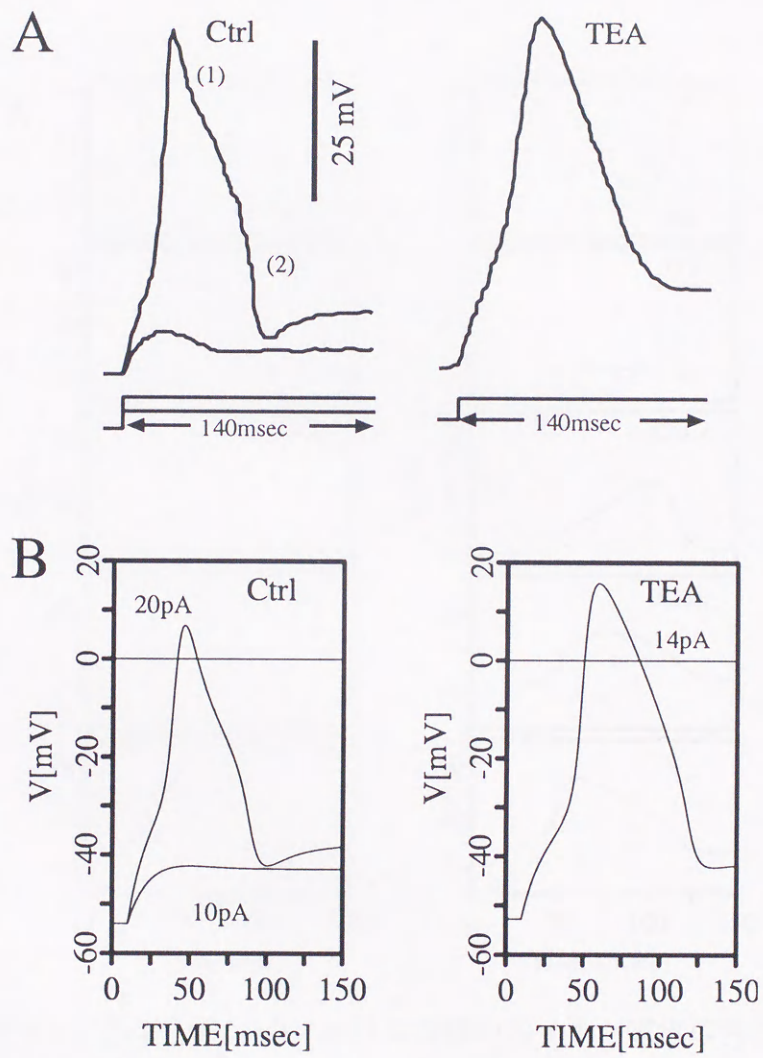


図 3.13 膜電流固定実験

A: トカゲ内節の膜電流固定時の膜電位応答, Ctrl: 通常溶液の膜電位応答, 固定電流は 10pA と 20pA, 20pA 固定時にスパイクの発生が見られる^[24]. TEA: TEA 混入時の膜電位応答, 固定電流は 14pA. B: A と同様の条件でのシミュレーション結果.

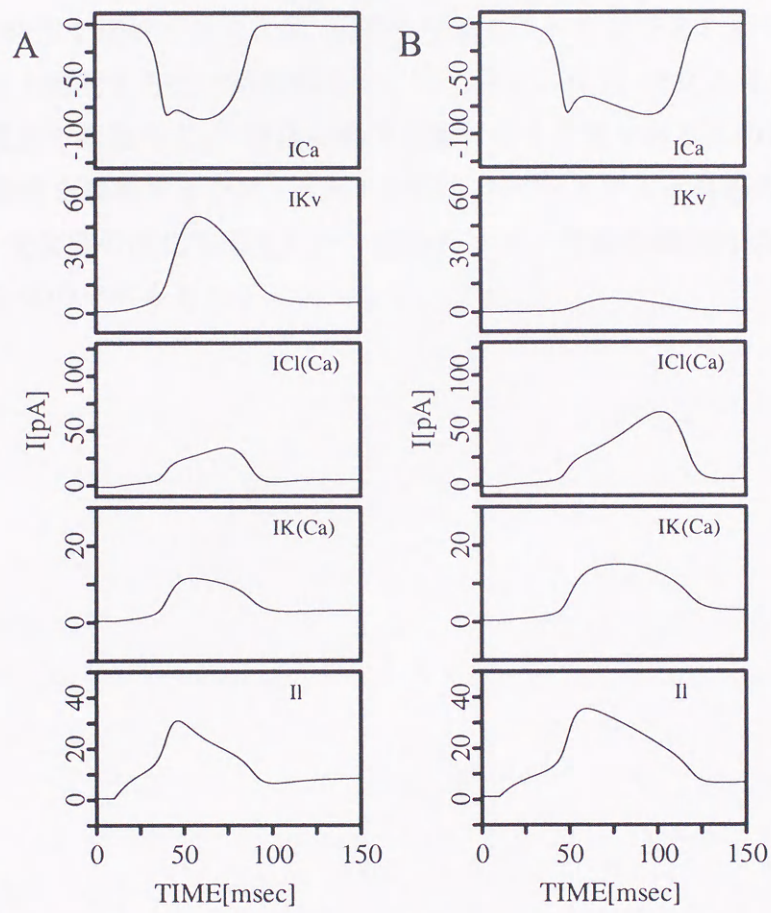


図 3.14 膜電流固定時における内節の各イオン電流の特性

A: Ctrl 時の各イオン電流の時間特性, B: TEA 混入時の各イオン電流の時間特性 ($\bar{g}_{Kv}=0.2$ nS).

3.6 まとめ

本章では、錐体内節のイオン電流特性を基に各イオン電流のモデル化を行い、実際の細胞応答特性が忠実に再現されることを確認した。さらに、本モデルを用いることにより、生理実験では測定困難な各イオン電流の時間特性と膜電位応答への関与を明確化することが可能となった。視細胞は、光刺激を電位応答へと変換する最も初期の情報処理過程を担う神経細胞であり、この特性を解析することは、網膜の2次ニューロンである水平細胞や双極細胞への情報伝達特性を解明する上で必須事項であると考えられる。そのためには、光応答時の内節の各イオン電流や細胞内 Ca^{2+} 機構の働きを解析する必要があるものと考えられる。次章ではこうした特性を解析するため、本章で提案した内節モデルと外節の光変換機構のモデルとを統合し、光受容の生化学的過程から内節のイオン電流や細胞内 Ca^{2+} 機構の働きを包含する視細胞全体のモデルをシミュレーションする。

第 4 章

視細胞モデルを用いた光応答解析

4.1 はじめに

視細胞の光応答は、外節の光感受性電流と内節の各イオン電流の相互作用により形成される。そのため、光応答には光感受性電流のダイナミクスだけでは説明できない一過性の過分極応答やピーク時間特性、光応答終了時の振動現象などが見られる。こうした現象の発生機構としては、内節の各イオン電流が考えられているが、生理実験により光応答時の各イオン電流の特性を解析することは困難である。そこで、本章では3章で提案した内節のイオン電流モデルと Torre らの光変換機構のモデルとを統合した視細胞モデルを構築し、光受容の生化学的な過程から光応答発生までのシミュレーションを可能とした。これにより、光応答時の内節の各イオン電流成分を分離し、光応答形成に重大な影響を及ぼすイオン電流成分を特定した。こうした解析から、光応答に見られる一過性の過分極応答やピーク時間特性、光応答終了時の振動現象などの諸現象を考察した。

4.2 内節モデルと外節モデルの統合

4.2.1 外節モデルの改良

外節の光感受性電流は、図 4.1 に示すように、反転電位が約 $0\sim 10\text{mV}$ であり、その膜電位変化に対する電流の変化も、視細胞の応答範囲内ではほぼ線形である。しかし、細胞外溶液に 2 価のカチオンが存在する場合には、過分極側で飽和する特性が見られる。また、光感受性電流の時間特性については、図 4.1-B のように時間的な活性化や不活性化は見られない。

以上の生理学的知見を考慮に入れ, Torre らの外節モデルと3章で構築した内節モデルとの統合を行った. まず, Torre らのモデルは膜電位変化を考慮に入れていないため, 膜電位変化に対する driving force の変化をモデルに組み込む必要がある. また, cGMP 依存性チャンネルが閉じた時に視細胞は過分極応答をするため, 過分極側での cGMP 依存性チャンネルの飽和特性は光応答にほとんど影響しないものと考えられる. そこで, 光感受性電流の膜電位依存性をほぼ線形と仮定しモデル化を行った (式(4.1)).

Torre らのモデルでは, 光感受性電流の最大電流 J_{max} と cGMP 濃度による開閉確率の積により電流値を求めていた. これに対して以下の式では, 最大コンダクタンスを規定し, この値と driving force, cGMP 濃度による開閉確率の積より電流を求めている. 光感受性電流の最大コンダクタンスについては, J_{max} が 5040pA, 反転電位を $E_p=10\text{mV}$, 静止膜電位を $V=-35\text{mV}$ と仮定すると, driving force ($V - E_p$) は 45mV となり, 最大コンダクタンス g_{max} が 112nS となる. さらに, Torre らのモデルは, Ca^{2+} 電流について求めているため, これを光感受性電流に変換する必要がある. そこで, 暗時の光感受性電流を 36pA とするため, 係数 (K_p) を 2 とした.

$$J = g_{max} \cdot K_p \cdot (V - E_p) \frac{g^3}{K^3 + g^3} \quad (4.1)$$

- g_{max} : 光感受性電流の最大コンダクタンス, 112[nS]
- V : 膜電位
- E_p : 光感受性電流の反転電位, 10[mV]
- K_p : 光感受性電流に変換するための係数, 2

4.2.2 内節モデルの改良

3章で構築した内節モデルは, 錐体内節の生理実験結果を基にしたものであるが, 杆体においても同様のイオン電流成分の存在が確認されており, ここでは錐体と杆体の内節の特性が同様であると仮定した. しかし, I_h については, 杆体と錐体とで電流の大きさが異なるため, Hestrin らの生理実験結果を基にコンダクタンスを $g_h=2.3$ とした^[36].

視細胞内節には, 外節から流入した Na^+ を排出するための Na^+-K^+ 交換機構が存在しており, 細胞内の3個の Na^+ と細胞外の2個の K^+ を交換している. 従って, この機構が働くことにより外向きの電流が観測される. また, 細胞内の K^+ 濃度は, 細胞外よりも高いため, K^+ が細胞膜を透過し細胞外へと流出している. このため, 視細胞の漏れ電流の反転電位は, 内節を単離した場合よりも過分極側にある.

以上の点を考慮に入れて、内節モデルの改良を行なった。まず、 Na^+ - K^+ 交換機構については、光応答による細胞内の Na^+ 濃度がそれほど大きく変化しないと考えられるため、常に Na^+ - K^+ 交換機構が働いており、定電流源として捉えることができる。このため、内節モデルに一定の外向き電流を加えることで、 Na^+ - K^+ 交換機構を導入することができる。この電流値は、暗時の光感受性電流を約36pAとし、 Na^+ による成分を全体の8割とすると、 Na^+ による電流は28.8pAとなり、排出電流はこの電流の3分の1であるため9.6pAとした。

漏れ電流の反転電位については、正確な値が生理実験により求められていないため、Maricqらの内節の生理実験結果より10mV過分極側の-55mVに設定した。以上の外節・内節統合モデルの電氣的等価回路を図4.2に示す。

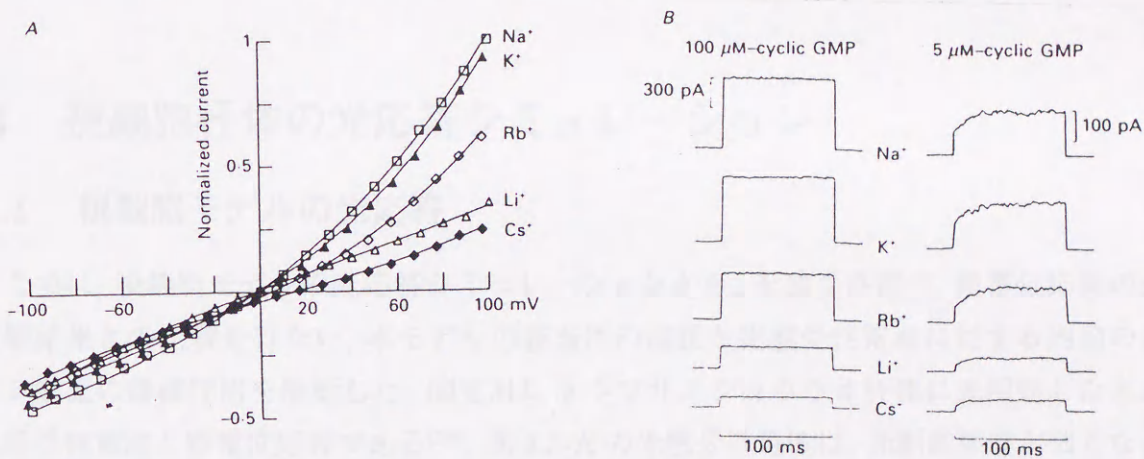


図 4.1 光感受性電流の特性

A:100 μM の cGMP 濃度下での光感受性電流の電流-電圧特性 (各溶液の値を Na 溶液時の電流に正規化), B:100 μM , 5 μM の cGMP 濃度における各溶液の時間特性^[37].

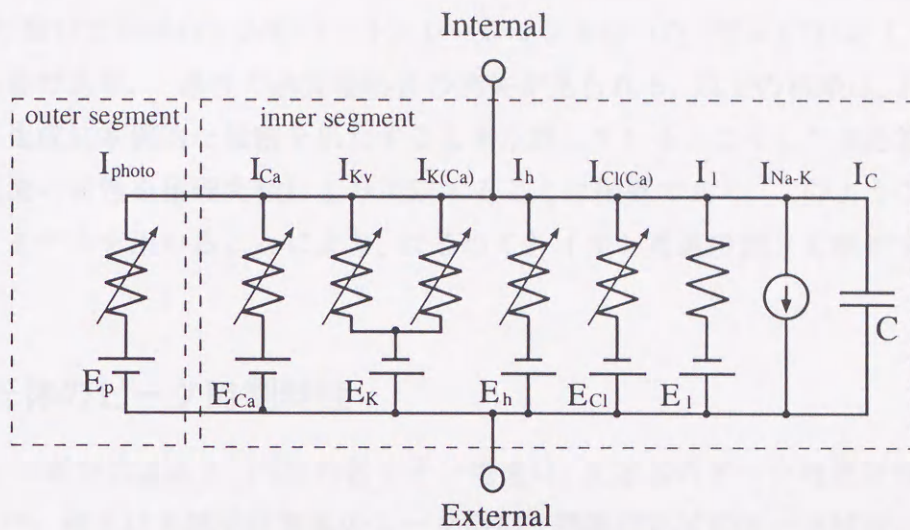


図 4.2 外節・内節統合モデルの電気的等価回路

4.3 視細胞杆体の光応答シミュレーション

4.3.1 視細胞モデルの光応答

ここでは、視細胞モデルの光応答シミュレーションから、光感受性電流、膜電位応答の生理実験結果との比較を行ない、本モデルの妥当性の確認と光感受性電流に対する内節の各イオン電流の修飾作用を解析した。図 4.3は、トラフサンショウウオ杆体に光照射したときの光感受性電流と膜電位応答である^[38]。図 4.3-A の光感受性電流は、光刺激強度が強くなるに従い外向き電流が減少・飽和する特性を示す。しかし、この時の膜電位応答は、図 4.3-B のように一過性の過分極応答が形成され、光感受性電流の時間特性と大きく異なる。こうした光感受性電流と膜電位応答の形成には、内節の各イオン電流が大きく関与しているものと考えられる。

図 4.4は、視細胞モデルを用いて光刺激のシミュレーションを行なった結果である。図 4.4-A は、光刺激強度を変化させたときの光感受性電流の時間特性であり、図 4.4-B はこのときの膜電位応答である。このシミュレーション結果からは、光感受性電流が飽和型の特性を示すのに対して、膜電位応答は一過性の過分極応答を生成しており、図 2.3の生理実験結果にほぼ対応する特性が見られる。こうした膜電位応答を形成する内節のイオン電流を図 4.4-C に示した。これらの各イオン電流の内、 I_h だけが遅れて活性化する外向き電流である

ため、この電流が一過性の過分極応答生成に大きく関与しているものと考えられる。このため、 I_h を取り除いて同様の光応答のシミュレーションを行った。図4.4-Dは、 $I_h=0$ とした時の膜電位応答であり、一過性の過分極応答の消失が見られる。以上の結果は、 I_h が一過性の過分極応答生成に本質的な役割を果たすことを示唆している。こうした光応答時の内節の各イオン電流の特性を生理実験により測定することは困難であり、このような生理学的知見に基づくモデルを用いることにより、はじめて各イオン電流の働きを解析することが可能となる。

4.3.2 杆体のピーク時刻特性

Baylorらの報告によると、内節の各イオン電流は、光応答のピーク時刻特性に影響を及ぼしている^[38]。彼らは光感受性電流のピーク時刻と膜電位応答のピーク時刻について比較を行ない、膜電位応答の方が早くピークに達することを生理実験により確認している。図4.5-Aは、トラフサンショウウオ杆体に弱い光刺激を加えた時の光感受性電流と膜電位応答を示している。図4.5-Bは、杆体51個について横軸を光感受性電流のピーク時刻、縦軸を膜電位応答のピーク時刻としてプロットしたものである。これらの図から、測定した全ての杆体について膜電位応答のピーク時刻が光感受性電流と比較して早いことが確認できる。こうした光感受性電流と膜電位応答のピーク特性についてシミュレーションを行なった結果が図4.6である。図4.6-Aは、光強度を変化させたときの光感受性電流と膜電位応答を示しており、図4.6-Dはこの時のピーク時刻特性を示している。図4.6-Dの黒点は通常モデル、白点は I_h を除去したときのものである。光刺激強度が弱い時には、どちらのモデルも膜電位応答のピークが早く、光刺激強度を強くするに従い I_h を除去したモデルは膜電位応答のピーク時刻が遅くなる。弱い光刺激では、膜電位依存性 Ca^{2+} 電流やカリウム電流の膜電位に対する非線形性により、双方のモデルの光応答のピークが早くなるが、強い光刺激では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の減少が生じるため、 $I_{Cl(Ca)}$ が減少し I_h を除去した場合にピーク時刻が遅くなる。以上の結果から I_h は、光強度を強くした時に膜電位応答のピーク時刻と応答時間の加速化に積極的な役割を果たしていることが確認された。つまり、杆体は、光感受性電流の光応答の遅さをカバーするため、 I_h を活性化させて膜電位応答を高速化している。しかし、この代償としてピーク振幅を犠牲にしているものと考えられる。

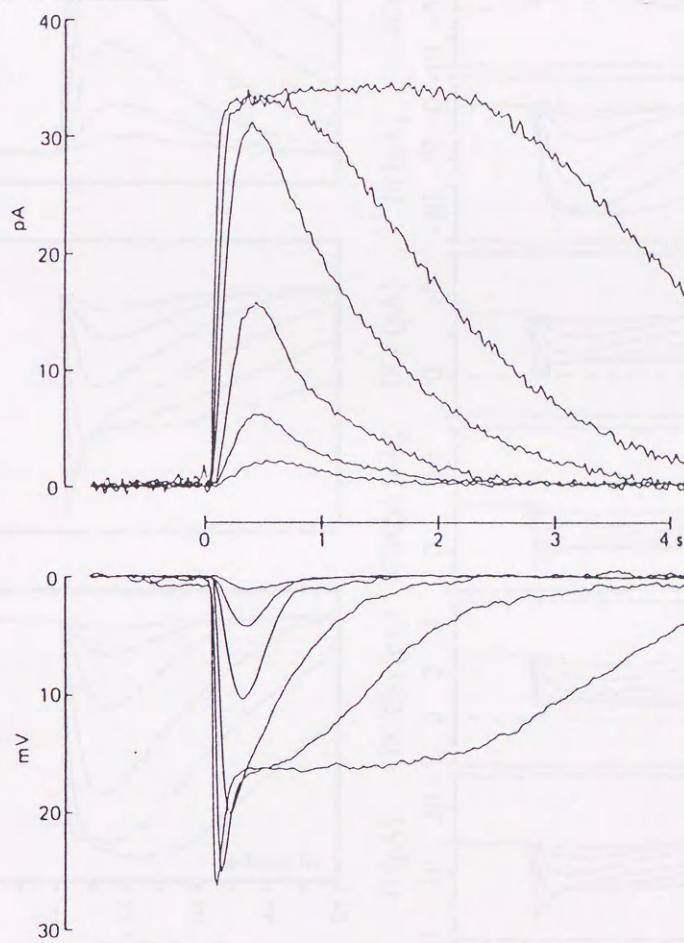


図 4.3 視細胞の光応答

トランスダクション桿体の光感受性電流と光応答. 光刺激強度は 1430, 255, 62.5, 11.4, 2.79, 1.4 photons μm^{-2} . 光刺激強度が強くなるに従い光感受性電流 (上図) は飽和する. これに対して光応答では, 一過性の過分極応答 (下図) が生じる [39].

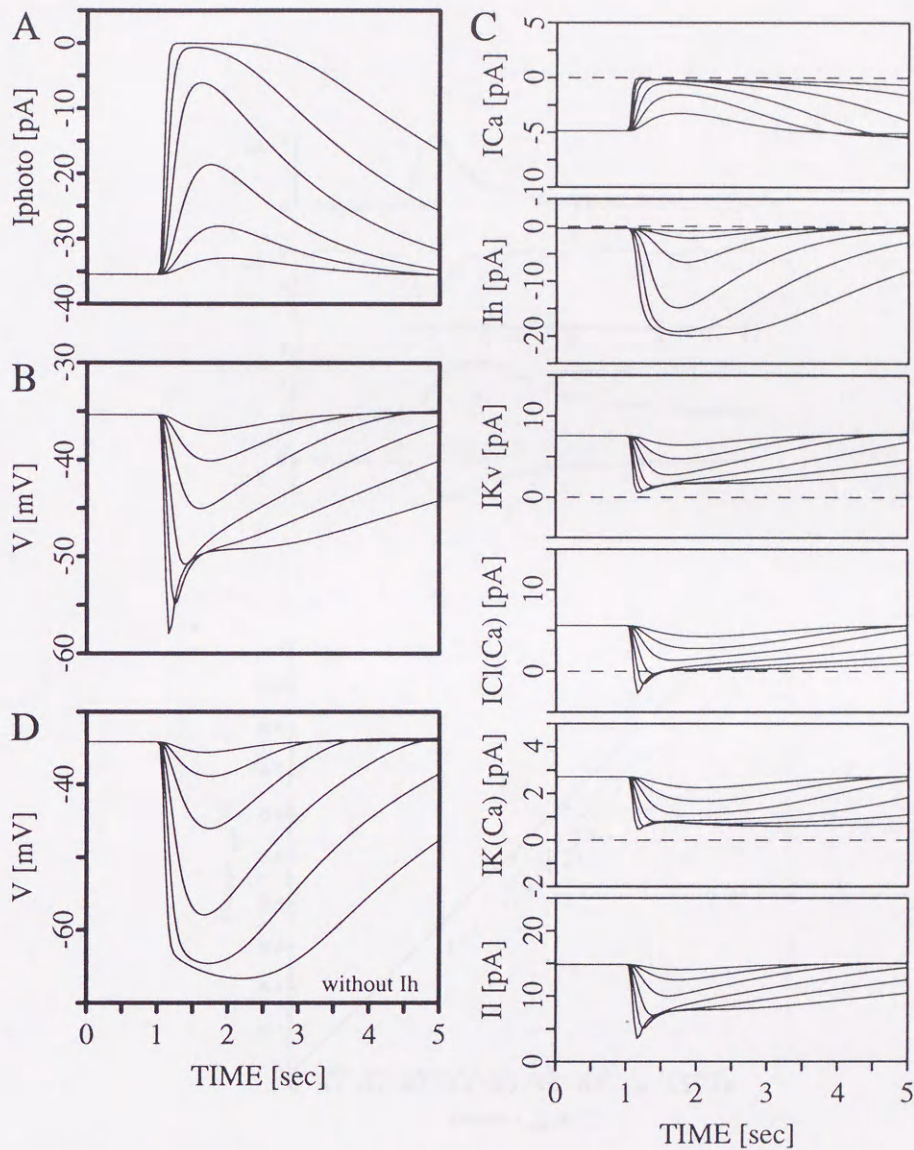


図 4.4 視細胞モデルのシミュレーション結果

A: 光刺激強度を変化させた時の光感受性電流の時間特性, 光刺激強度は, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 Rh^*/sec , 刺激時間はそれぞれ 0.05msec B: 同様の光刺激時の光応答 (図 4.3に見られる一過性の過分極応答が生じている). C: 各イオン電流の時間特性, D: I_h を取り除いた時の光応答 (一過性の過分極応答が消失している).

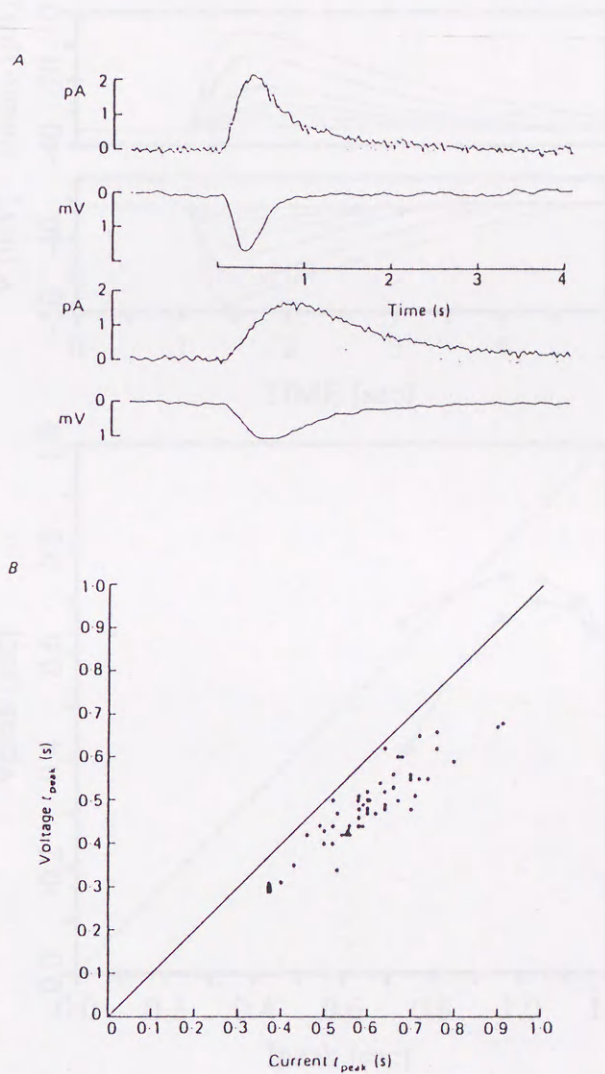


図 4.5 杆体のピーク時間特性^[38]

A: トラフサンショウオ杆体の光感受性電流と光応答. 上下の2組はそれぞれ別の杆体による記録. 光刺激強度は, 上図が $5.32 \text{ photons } \mu\text{m}^{-2}$, 下図が $0.98 \text{ photons } \mu\text{m}^{-2}$ である.

B: 51 個の杆体について弱い光刺激を加え, その膜電位と光感受性電流のピーク時間特性について示した図である. この図から, 全ての杆体で, 光感受性電流よりも光応答の方が早くピークに達していることが分かる.

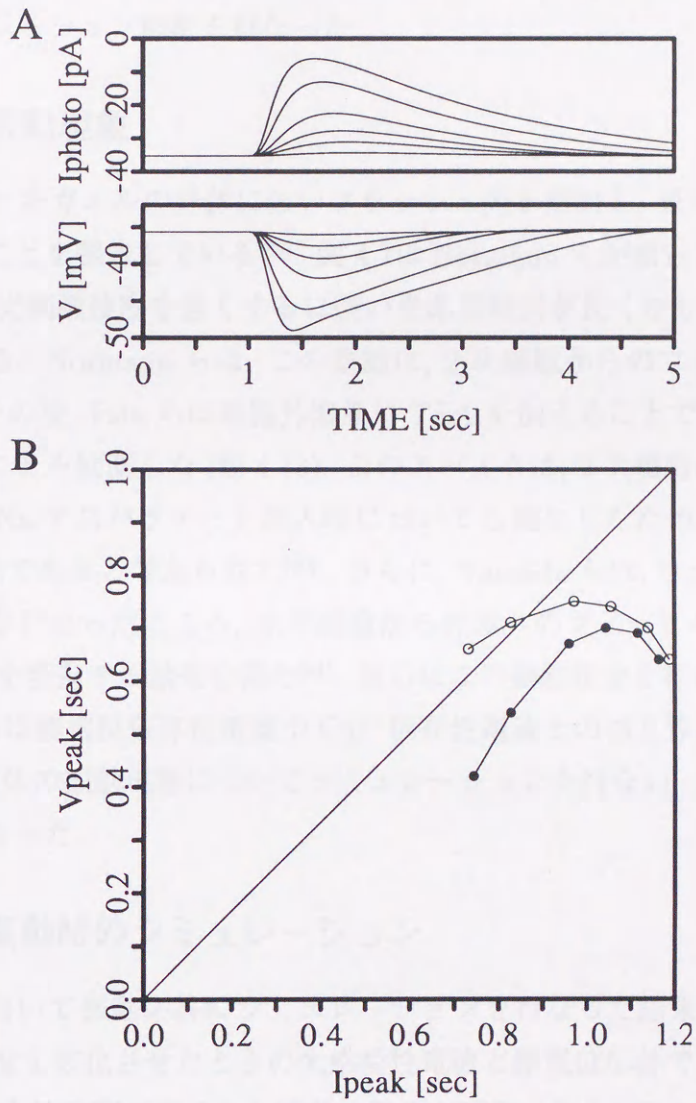


図 4.6 視細胞モデルのピーク時刻特性

A: 光刺激強度を変化させた時の光感受性電流と光応答 (光刺激強度は, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 3.0 Rh^*/sec), B: 光応答と光感受性電流のピーク時刻特性, 黒点は I_h 存在時, 白点は I_h を除去した時のもの (光刺激強度は A と同様).

4.4 杆体の振動現象とシミュレーション解析

先に示したシミュレーション結果により、本視細胞モデルと実際の視細胞との妥当性が確認された。そこで本節では、この視細胞モデルを用いた解析の一例として、杆体の振動現象についてシミュレーション解析を行なった。

4.4.1 杆体の振動現象

Normann らは、ヒキガエルの杆体に強いフラッシュ光を照射し、長時間過分極させた後に振動が発生することを報告している^[39]。図 4.7 は Normann らが測定した生理実験結果である。この図から、光刺激強度を強くするに従い光応答時間が長くなり、その終了時に振動の発生が確認される。Normann らは、この振動は、2次細胞からのフィードバックに由来するものとした。その後、Fain らは細胞外溶液に TEA を加えることで、光応答終了時にスパイクが発生することを観測した(図 4.13)。このスパイクは、2次細胞からのフィードバック入力を阻害する Na アスパラテート混入時においても発生したため、こうしたスパイクは、杆体独自の特性であると考えられた^[40]。さらに、Yamada らは、ウシガエル杆体を用いて振動現象の実験を行なったところ、水平細胞から杆体へのフィードバックによる Normann らの考えを否定する結果を得た^[41]。彼らはこの振動現象を杆体独自の応答であるとし、その発生機構は膜電位依存性電流や Ca^{2+} 依存性電流との相互作用によるものとした。本節では、こうした杆体の振動現象についてシミュレーションを行ない、その発生メカニズムについて考察を行なった。

4.4.2 光応答振動時のシミュレーション

視細胞モデルを用いて振動応答のシミュレーションを行なった結果が図 4.8 である。図 4.8-A は、光刺激強度を変化させたときの光感受性電流と膜電位応答である。光刺激強度を強くするに従い、光応答時間が長くなり振動の発生が観測される。図 4.8-B はこの振動部分について拡大したもので、Normann らの生理実験結果に近い振動応答が見られる。このモデルでは、2次細胞からのフィードバック成分を加えていないため、この振動現象は杆体独自の応答であるとする Fain, Yamada らの説を裏付けるものである。次に、この振動発生のメカニズムについて、内節の各イオン電流、細胞内 Ca^{2+} 機構の特性を基に解析を進める。

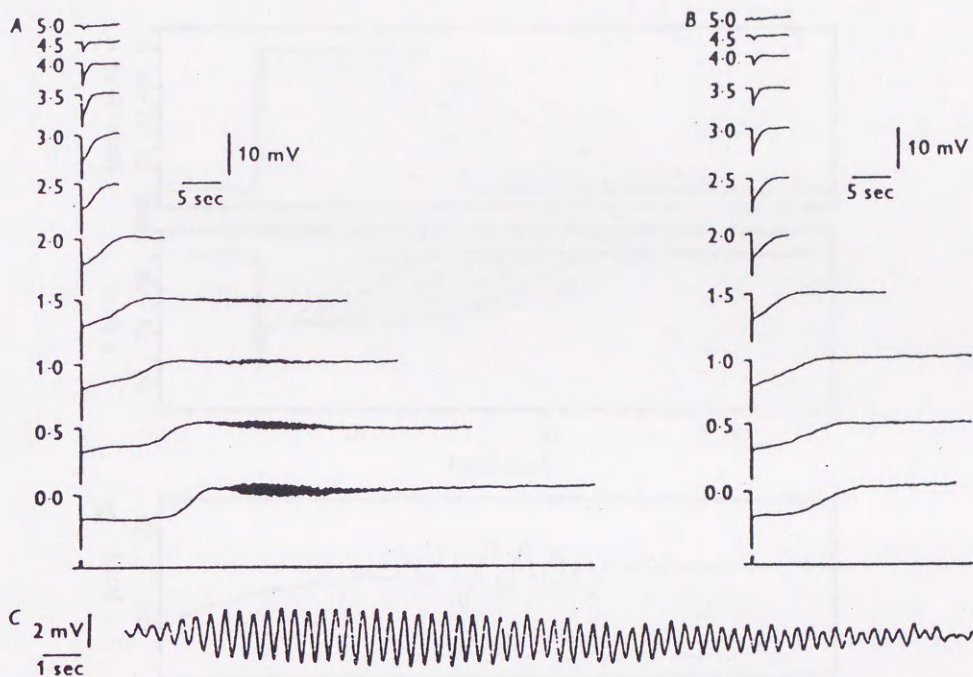


図 4.7 視細胞光応答の振動現象

A: 振動時の視細胞の光応答 (刺激光の直径は $1200\mu\text{m}$), B: 同様の細胞で刺激光の直径を $50\mu\text{m}$ とした時の光応答. C: A の振動応答の拡大図 (刺激強度は $0.0\log$)^[39].

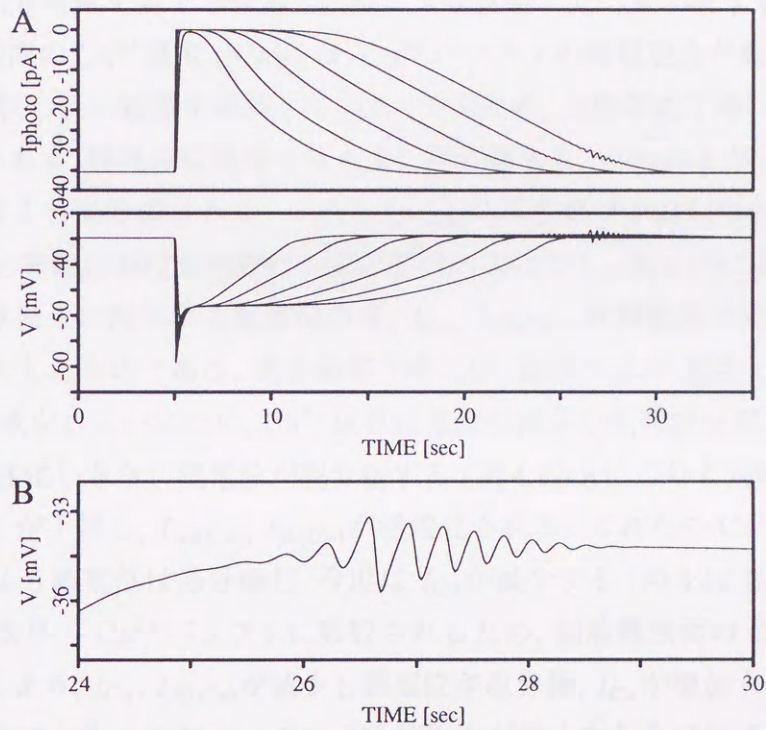


図 4.8 視細胞モデルによる光応答の振動

A: 光刺激強度を 1.0, 3.0, 10, 30, 100, 300 Rh^* とした時の膜電位応答と光感受性電流の時間特性, 刺激時間は 50msec(内節の各パラメータを次のように設定した. $g_{Ca}=1.5$, $Cl_h=0.45$, $g_{Kv}=2.4$, $g_{Kc}=1.0$, $E_{Cl}=-55$). 100 と 300 Rh^* 時に振動が発生する. B: 光刺激強度 300.0 Rh^* 時の振動応答の拡大図

4.4.3 光応答振動現象の解析

図4.9と図4.10は、光応答の振動発生時の内節の各イオン電流、細胞内 Ca^{2+} 濃度の時間変化を示したものである。視細胞の光応答時には、膜電位が過分極するために I_{Ca} が不活性化される (図4.9- I_{Ca})。このため、細胞内の Ca^{2+} は、 Na^+ - K^+ 交換機構と Ca-ATPase による排出を受けて低下する (図4.10- $[\text{Ca}]_s, [\text{Ca}]_f$)。これと同時に Ca^{2+} バッファの Ca^{2+} 吸着濃度も低下する。こうした細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下は、 Ca^{2+} 依存性電流である $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ や $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ を不活性化させ、外向き電流を低下させる。このような状態で光応答が終了すると、 I_{Ca} は活性化されるが、細胞内の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}]_s$) は、 Ca^{2+} バッファの吸収能力が高いため、流入した Ca^{2+} の多くを吸収し低い状態を維持している。そのため、光応答終了時においても $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ 、 $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ は活性化されず、膜電位は暗時よりも少し脱分極する。これにより、 I_{Ca} はさらに活性化され、膜電位はより脱分極される。こうした I_{Ca} の活性化が振動発生 of 主な要因となる。このような光応答時における内節の一連のプロセスにつて、図4.11に示した。

図4.12は、振動発生に關与する膜電位応答、 I_{Ca} 、 $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ 、細胞膜領域の Ca^{2+} 濃度の振動部分について拡大したものである。光応答終了時には、細胞内 Ca^{2+} 濃度と Ca^{2+} バッファの Ca^{2+} 吸着濃度が減少しているため、 Ca^{2+} 依存性電流が減少し膜電位は脱分極している。このため、 I_{Ca} が活性化しさらに膜電位が脱分極する (図4.12-A)。これと同時に細胞膜領域の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}]_s$) が上昇し、 $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ 、 $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ が活性化される。これらの Ca^{2+} 依存性の外向き電流の活性化により膜電位は過分極し、今度は I_{Ca} が減少する (図4.12-B)。しかし、細胞膜表面の Ca^{2+} は、素早く Ca^{2+} バッファに吸収されるため、細胞膜表面の Ca^{2+} 濃度は直ちに減少する。これにより、 I_{Ca} 、 $I_{\text{K}(\text{Ca})}$ が減少し膜電位が脱分極、 I_{Ca} が増加する (図4.12-C)。こうした一連の挙動は、遅い Ca^{2+} バッファの吸収能力が無くなるまで持続される。以上のような桿体の振動現象は、 I_{Ca} 、 Ca^{2+} 依存性電流、細胞内 Ca^{2+} 機構の相互作用として発生している。

以上の解析結果は、振動発生原因を I_{Ca} によるとする、従来の漠然とした知見を、 I_{Ca} 、 Ca^{2+} 依存性電流、細胞内 Ca^{2+} 機構の相互作用であるとする、新たな仮説を提案したものである。今後、生理実験により、この仮説の真偽が実証されるものと考えられる。

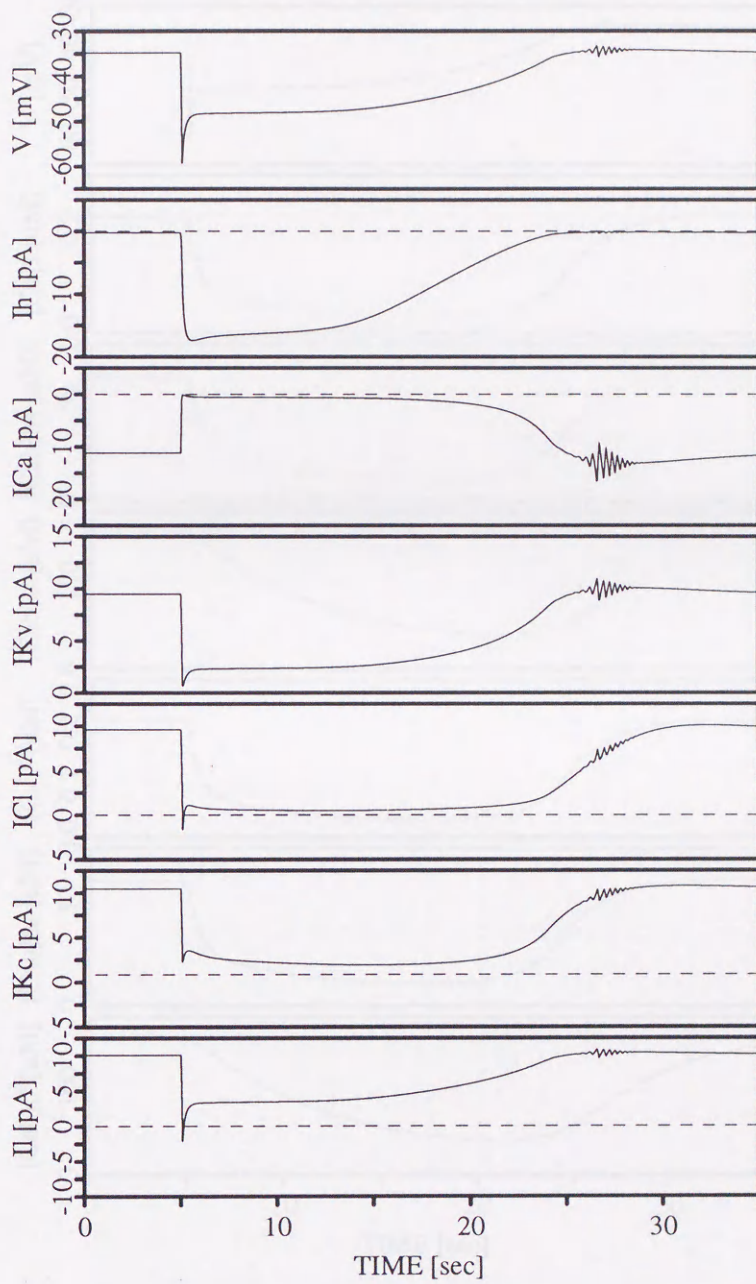


図 4.9 振動時の内節イオン電流の時間特性

光刺激強度 300.0 Rh*時の内節イオン電流の特性. I_h : 過分極活性化型電流, I_{Ca} : Ca^{2+} 電流, I_{Kv} : 膜電位依存性カリウム電流, $I_{Cl(Ca)}$: Ca^{2+} 依存性塩素電流, $I_{K(Ca)}$: Ca^{2+} 依存性カリウム電流, I_l : 漏れ電流.

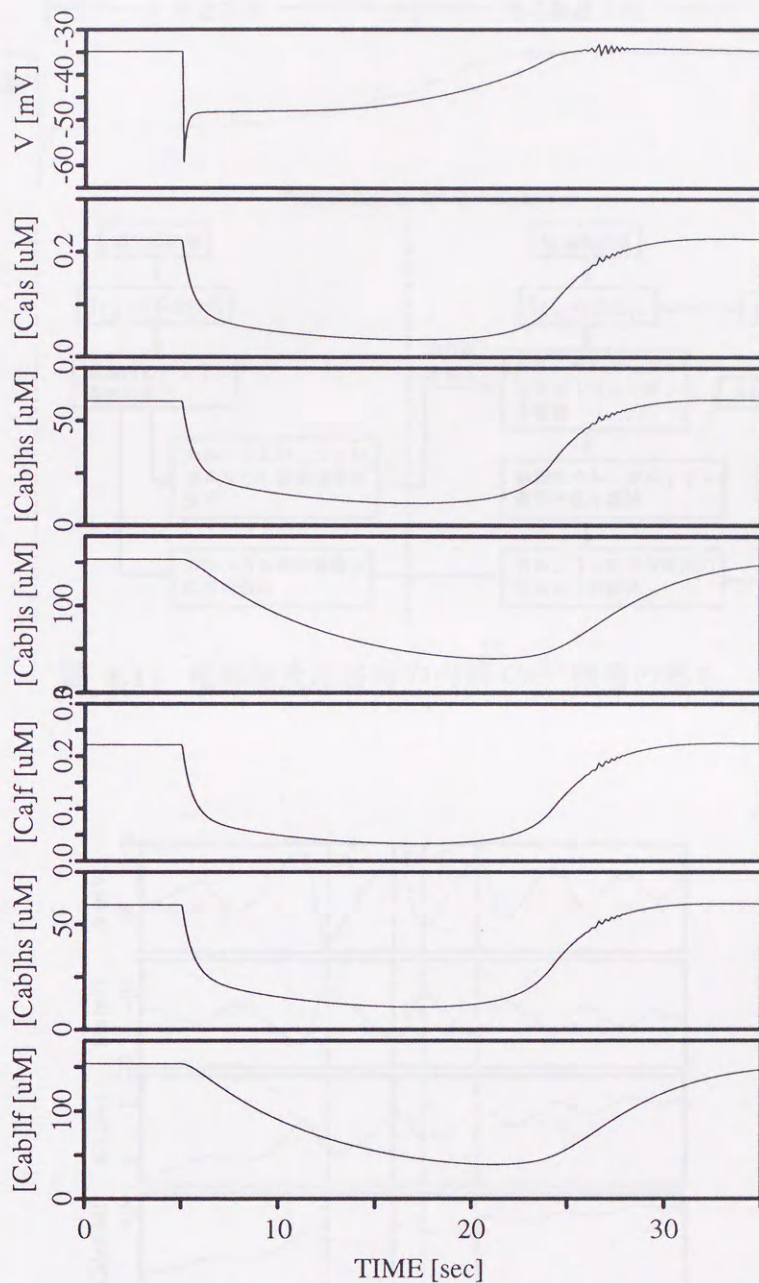


図 4.10 振動時の内節 Ca^{2+} 濃度の変化

光刺激強度 300.0Rh^* 時の内節の各 Ca^{2+} 濃度変化. $[\text{Ca}]_s$: 細胞膜領域の Ca^{2+} 濃度, $[\text{Cab}]_{hs}$ ・ $[\text{Cab}]_{ls}$: 細胞膜表面の高吸着性・低吸着性バッファの Ca^{2+} 吸着濃度, $[\text{Ca}]_f$: 細胞内深部の Ca^{2+} 濃度, $[\text{Cab}]_{hf}$ ・ $[\text{Cab}]_{lf}$: 細胞内深部の高吸着性・低吸着性バッファの Ca^{2+} 吸着濃度.

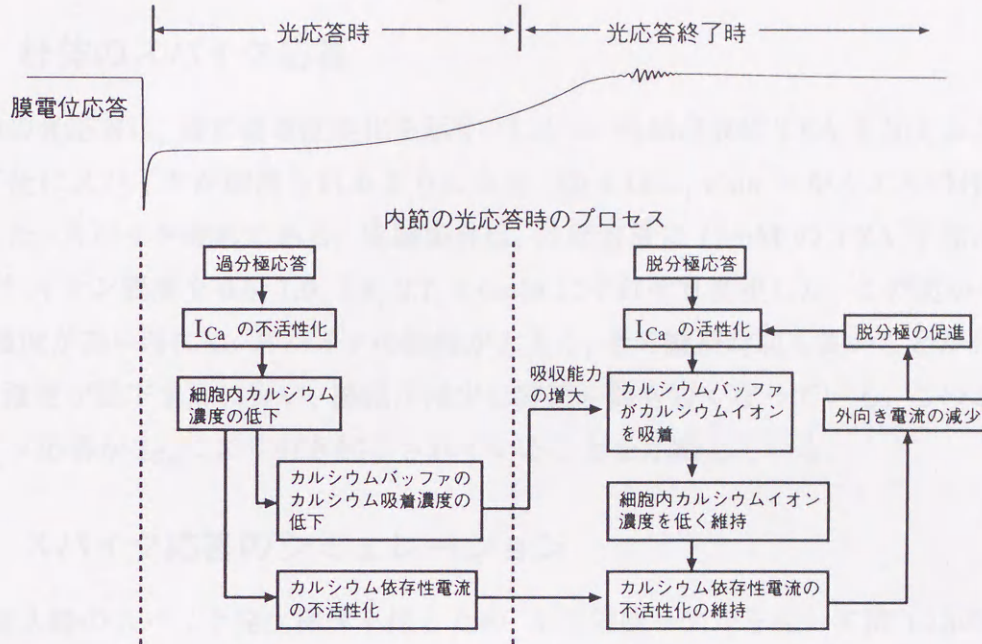


図 4.11 視細胞光応答時の内節 Ca²⁺機構の働き

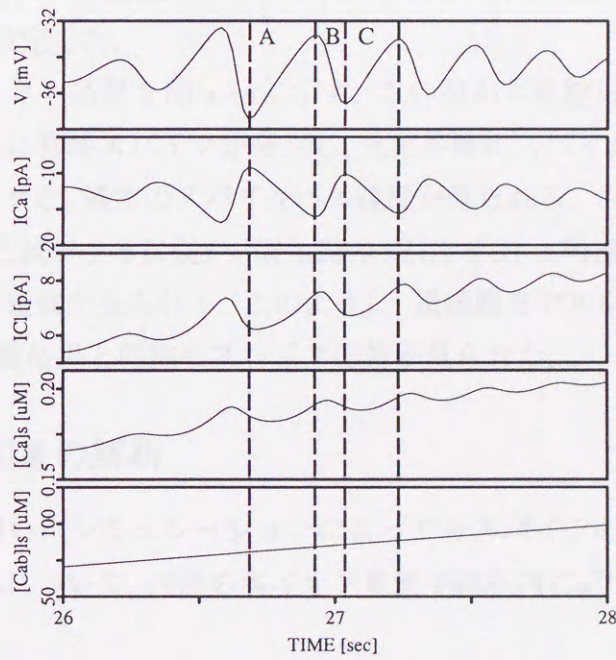


図 4.12 膜電位振動の拡大図

4.5 TEA 混入によるスパイク現象

4.5.1 杆体のスパイク応答

視細胞の光応答は、通常緩電位変化を示す。しかし、外部溶液に TEA を加えることで、光応答終了後にスパイクが観測されるようになる。図 4.13 は、Fain らがカエルの杆体を用いて観測した、スパイク波形である。実験条件は、外部溶液に 12mM の TEA を加えて、細胞外の Ca^{2+} イオン濃度を 0.5, 1.0, 1.8, 2.7, 3.6mM にそれぞれ変更した。この図から、細胞外の Ca^{2+} 濃度が高い時には、スパイクの振幅が大きく、その継続時間も長いことがわかる。また、 Ca^{2+} 濃度が低下するに従い、振幅が減少し継続時間も短くなっている。このことは、このスパイク応答が I_{Ca} により引き起こされていることを示唆している。

4.5.2 スパイク応答のシミュレーション

TEA 混入時のスパイク発生機構を探るため、本視細胞モデルを用いて図 4.13 の生理実験に対応するシミュレーションを行なった。TEA は、膜電位依存性カリウム電流の阻害剤であるため、カリウム電流のコンダクタンスを 2.4nS から 0.2nS へと低下させ、細胞外の Ca^{2+} 濃度変化をそれぞれの濃度に $[\text{Ca}]_o$ を設定した。また、細胞外の Ca^{2+} 濃度変化によるカルシウム電流のコンダクタンス変化については、2.7, 1.8, 1.0, 0.5mM の各濃度で、それぞれ 1.5, 0.9, 0.5, 0.3nS に設定した。

以上のシミュレーション結果を図 4.14 に示す。この図から細胞外の Ca^{2+} 濃度が 2.7mM では、図 4.13-D のように常時スパイクが発生し、光応答時にスパイクの消失、光応答終了後に振幅の大きなスパイクと、通常スパイクへの復帰が見られる。さらに、細胞外の Ca^{2+} 濃度が 1.8, 1.0, 0.5mM と減少するに従い、図 4.13 の (E)(F)(G) と同様にスパイク振幅の減少とスパイク発生時間の短縮が見られる。このように、視細胞モデルを用いたシミュレーションによっても、生理実験結果と同様のスパイク応答が見られた。

4.5.3 スパイク現象の解析

本視細胞モデルを用いたシミュレーションによってもスパイクの発生が見られた。そこでスパイク発生の機構について、内節の各イオン電流や細胞内 Ca^{2+} 機構の特性を基に解析を行なった。

図 4.15 と図 4.16 は、各 Ca^{2+} 濃度時の光感受性電流と内節の各イオン電流の時間特性について示したものである。これらの図から、光応答終了後に内節の Ca^{2+} 電流が活性化し、ス

パイクが発生している。また、細胞外の Ca^{2+} 濃度が低下すると Ca^{2+} 電流の振幅が小さくなり、スパイク応答振幅も減少する。

図 4.17 は、各外部溶液時の細胞膜領域の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}]_s$) と、高吸着性・低吸着性バッファ ($[\text{Ca}]_{hs}$, $[\text{Ca}]_{ls}$) の Ca^{2+} 吸着基質濃度を示している。この図から、細胞外の Ca^{2+} 濃度が低下するに従い、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下し、これと同時に Ca^{2+} バッファの Ca^{2+} 吸着基質濃度も低下する。細胞内 Ca^{2+} 濃度と高吸着性バッファの濃度変化はほぼ同様であるが、低吸着性バッファの濃度変化はかなり遅れて減少・増加する。従って、光応答終了時の低吸着性バッファの Ca^{2+} 吸着基質濃度は、暗時に比べてかなり減少しており、 Ca^{2+} 吸着能力が高い状態となっている。このため、 Ca^{2+} 電流の突発的活性化で増加した細胞内 Ca^{2+} を、このバッファが瞬時に吸収し、素早く細胞膜表面の Ca^{2+} 濃度を減少させる。細胞内 Ca^{2+} 濃度の減少は、 Ca^{2+} 依存性電流 ($I_{Cl(\text{Ca})}$, $I_{K(\text{Ca})}$) を減少させ、膜電位の脱分極と Ca^{2+} 電流の活性化を引き起こす。これにより、再度 Ca^{2+} 電流がスパイク的に活性化される。

以上のように、TEA 混入によるスパイクは、光応答の振動とほぼ同様の機構により発生している。

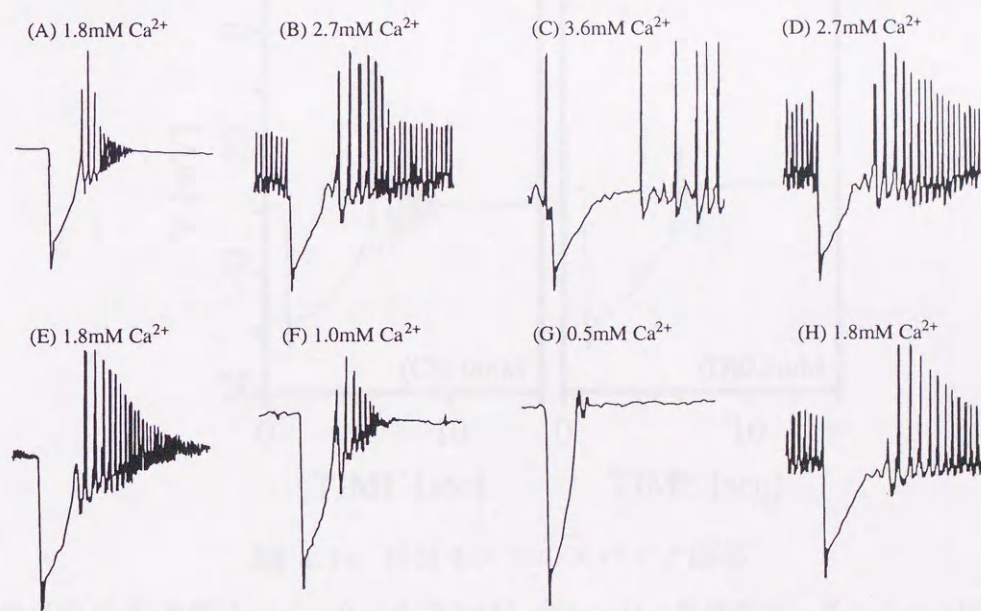


図 4.13 カエル杆体のスパイク応答^[40]

細胞外の Ca^{2+} 濃度を変化させた時のカエル杆体の光応答。光刺激は、フラッシュ時間 109msec で光強度 $9.3 \log \text{ quanta/cm}$ 、波長は 516nm。全ての実験で 12mM の TEA を細胞外溶液に加えた。

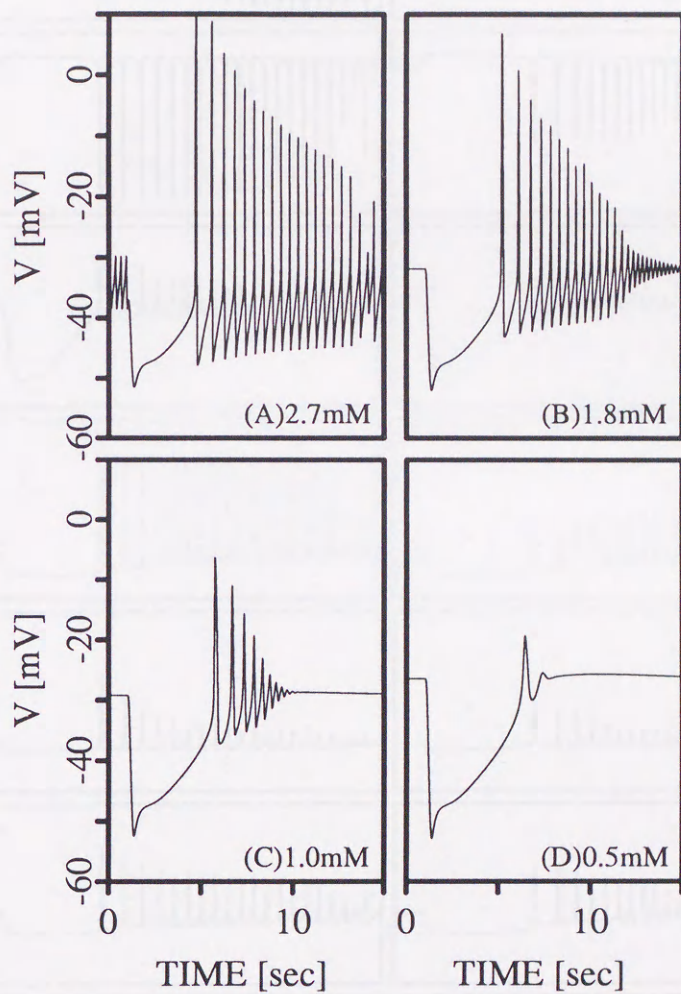


図 4.14 杆体モデルのスパイク応答

細胞外の Ca^{2+} 濃度は、2.7, 1.8, 1.0, 0.5mM. カルシウム電流のコンダクタンスは、それぞれ 1.5, 0.9, 0.5, 0.3nS に設定した ($g_{Kv} = 0.2\text{nS}$, $Cl_h = 0.45 \mu\text{M}$, $g_{Cl} = 6.5\text{nS}$).

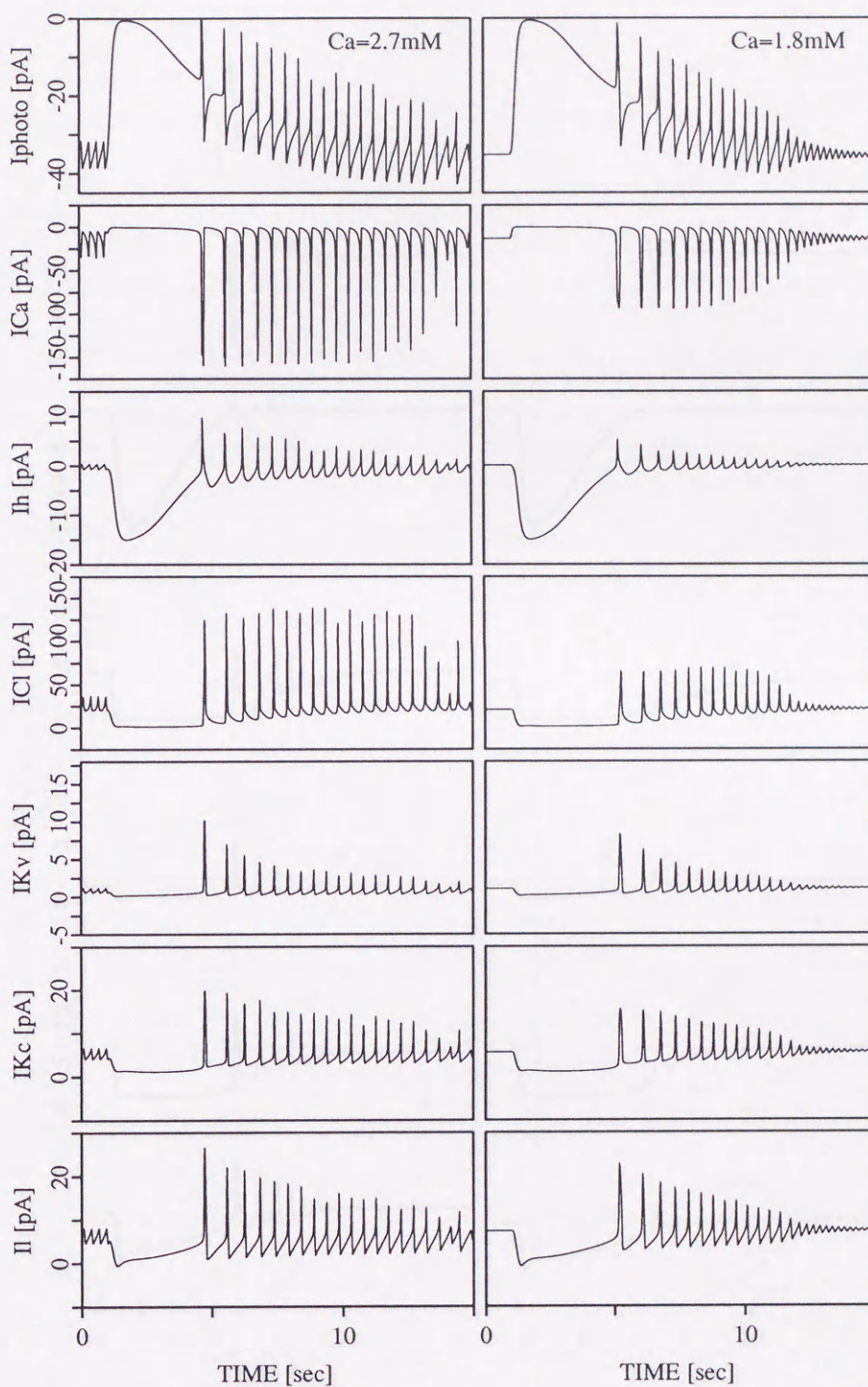


図 4.15 スパイク応答時の内節の各イオン電流 (2.7, 1.8mM)

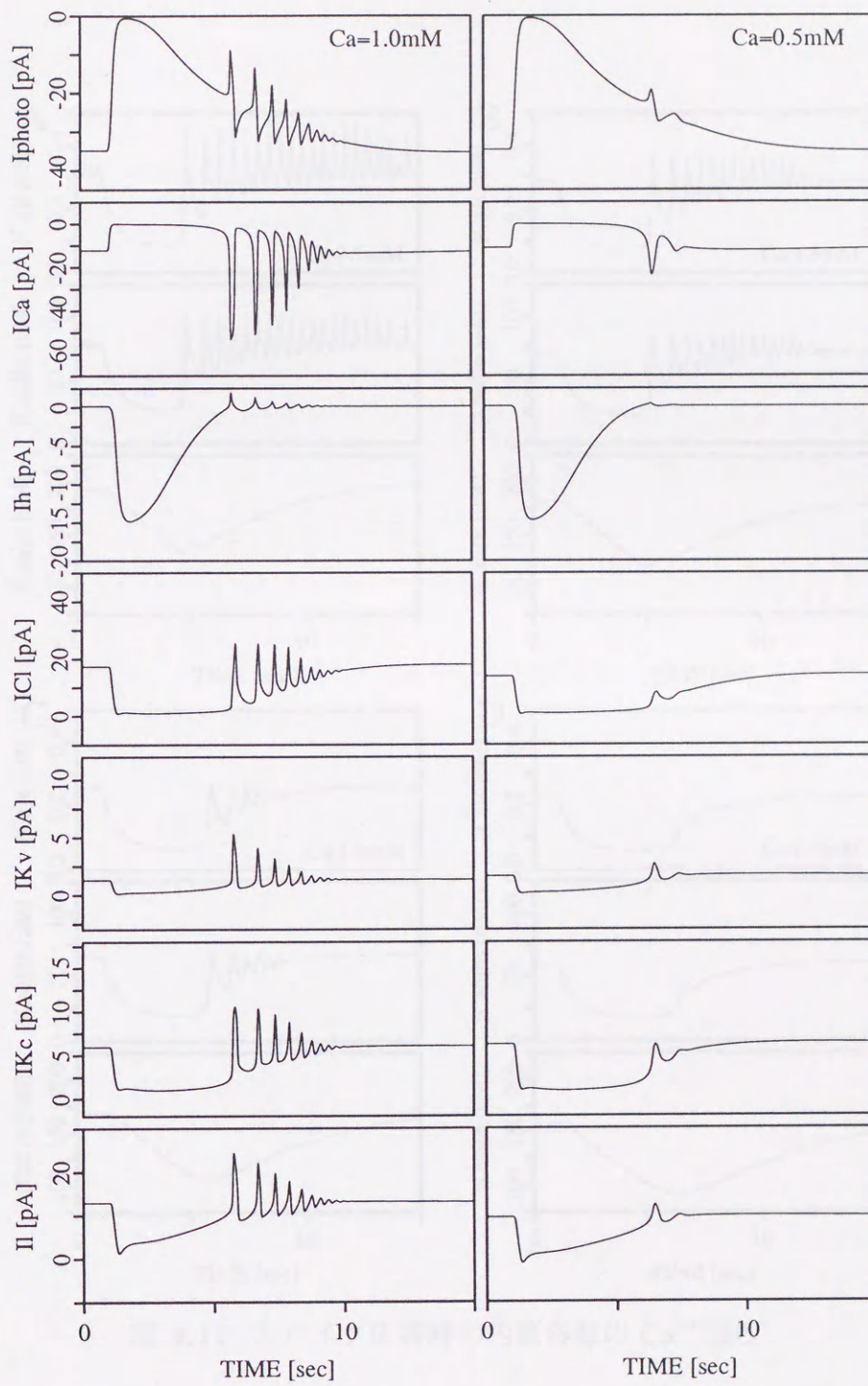


図 4.16 スパイク応答時の内節の各イオン電流 (1.0, 0.5mM)

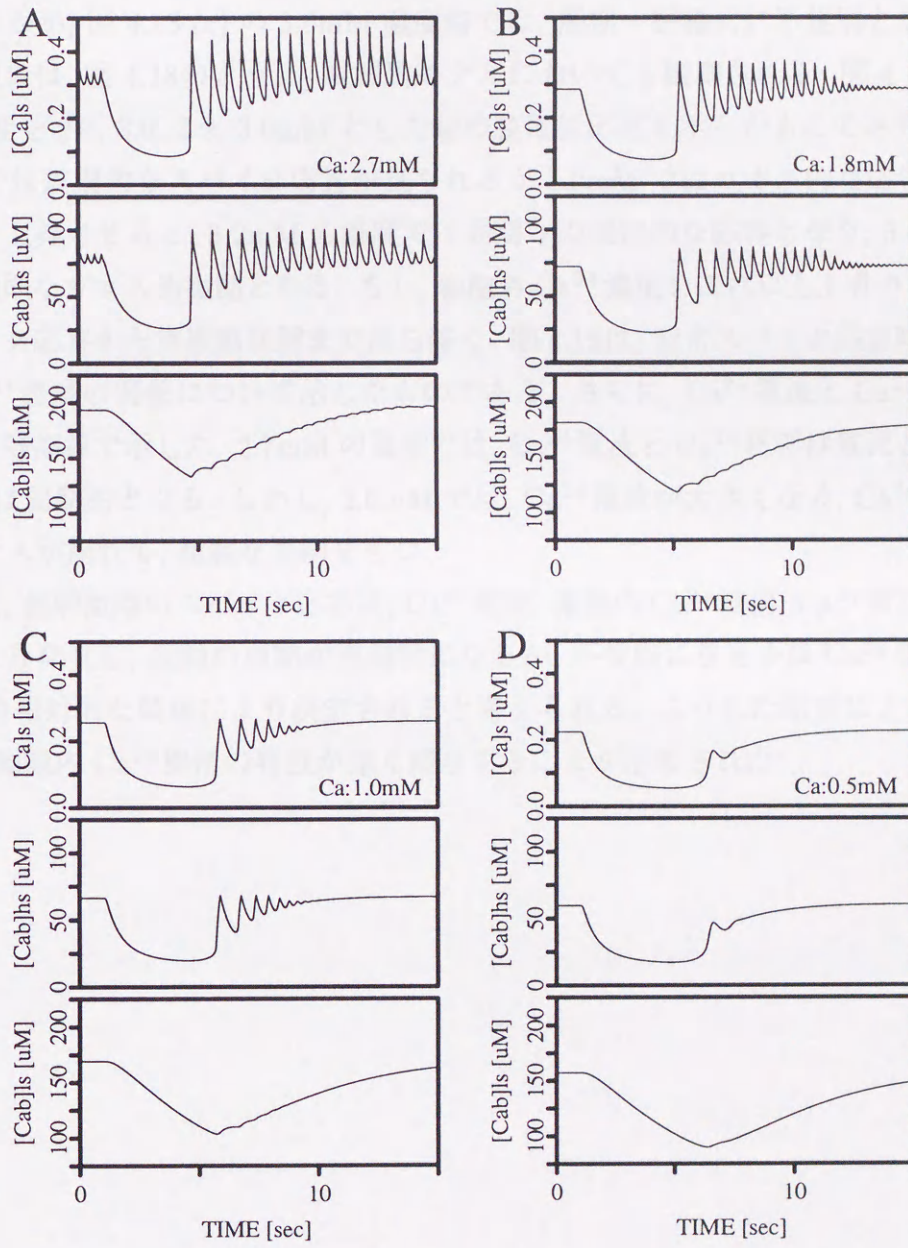


図 4.17 スパイク応答時の内節各部の Ca^{2+} 濃度

4.6 TEA 混入による定常スパイク応答

図 4.13では、細胞外の Ca^{2+} 濃度を 2.7mM や 3.6mM と高くすることにより、定常的にスパイク応答が見られるようになる。図 4.13-(B) の 2.7mM 濃度時では、スパイク周期と振幅が一定であるが、図 4.13-(c) の 3.6mM 濃度時では、周期・振幅共に不規則となる。こうした不規則現象は、図 4.18のように、視細胞モデルにおいても観測される。図 4.18は、細胞外の Ca^{2+} 濃度を 2.7, 3.0, 3.2, 3.6mM とした時の膜電位応答を示したものであり、2.7mM の Ca^{2+} 濃度では規則的なスパイク応答が見られるが 3.0mM ではカオス的な応答となる。さらに濃度を上昇させると、3.2mM の濃度では周期 3 の規則的な応答となり、3.6mM 濃度では再度不規則なカオス的振動となる。もし、細胞外 Ca^{2+} 濃度をこれ以上上昇させると、周期的なスパイク応答から無振動状態まで落ち着く。図 4.19は、定常スパイク応答時の膜電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度の関係について示したものである。さらに、 Ca^{2+} 電流と Ca^{2+} 依存性塩素電流の値も等高線で示した。2.7mM の濃度では、 Ca^{2+} 電流と Ca^{2+} 依存性電流とが拮抗するため、振動は周期的となる。しかし、3.0mM では、 Ca^{2+} 電流が大きくなり、 Ca^{2+} 依存性電流とのバランスが崩れて、複雑な周期をもつ。

こうした、無刺激時のスパイク応答は、 Ca^{2+} 電流、細胞内 Ca^{2+} 機構、 Ca^{2+} 依存性電流の相互作用により発生し、振動の周期が規則的になるか、不規則になるかは Ca^{2+} 依存性電流と Ca^{2+} 電流の相対的な関係により決定されると考えられる。こうした結果により、スパイク応答には、細胞内 Ca^{2+} 機構の特性が深く関与することが示唆された。

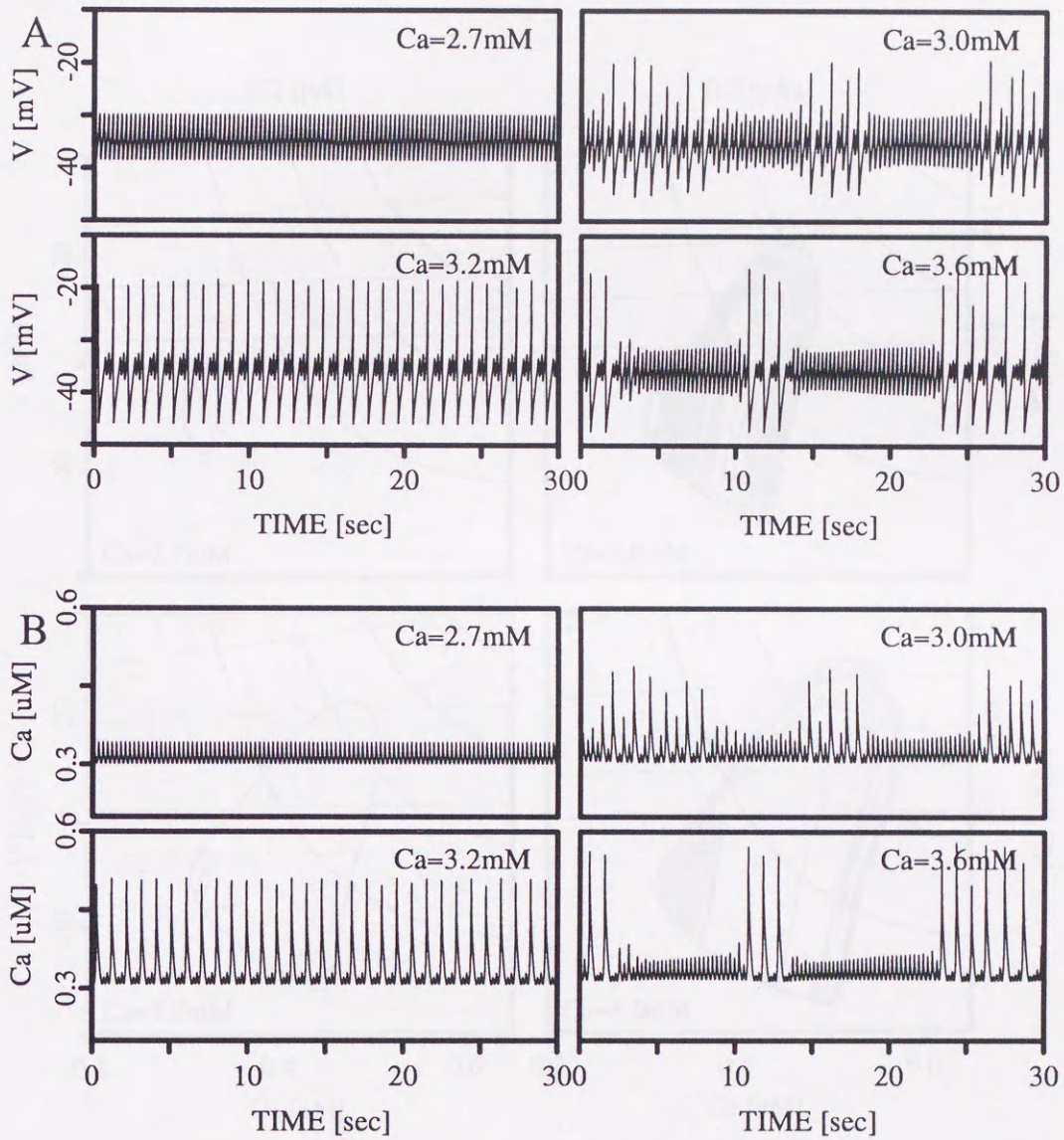


図 4.18 Ca^{2+} 濃度を変化させた時の定常スパイク応答

A:細胞外の Ca^{2+} 濃度とコンダクタンスをそれぞれ, 2.7, 3.0, 3.2, 3.6mM, 1.5, 1.7, 1.833, 2.1nS とした時の膜電位応答. B:細胞膜表面の Ca^{2+} 濃度変化.

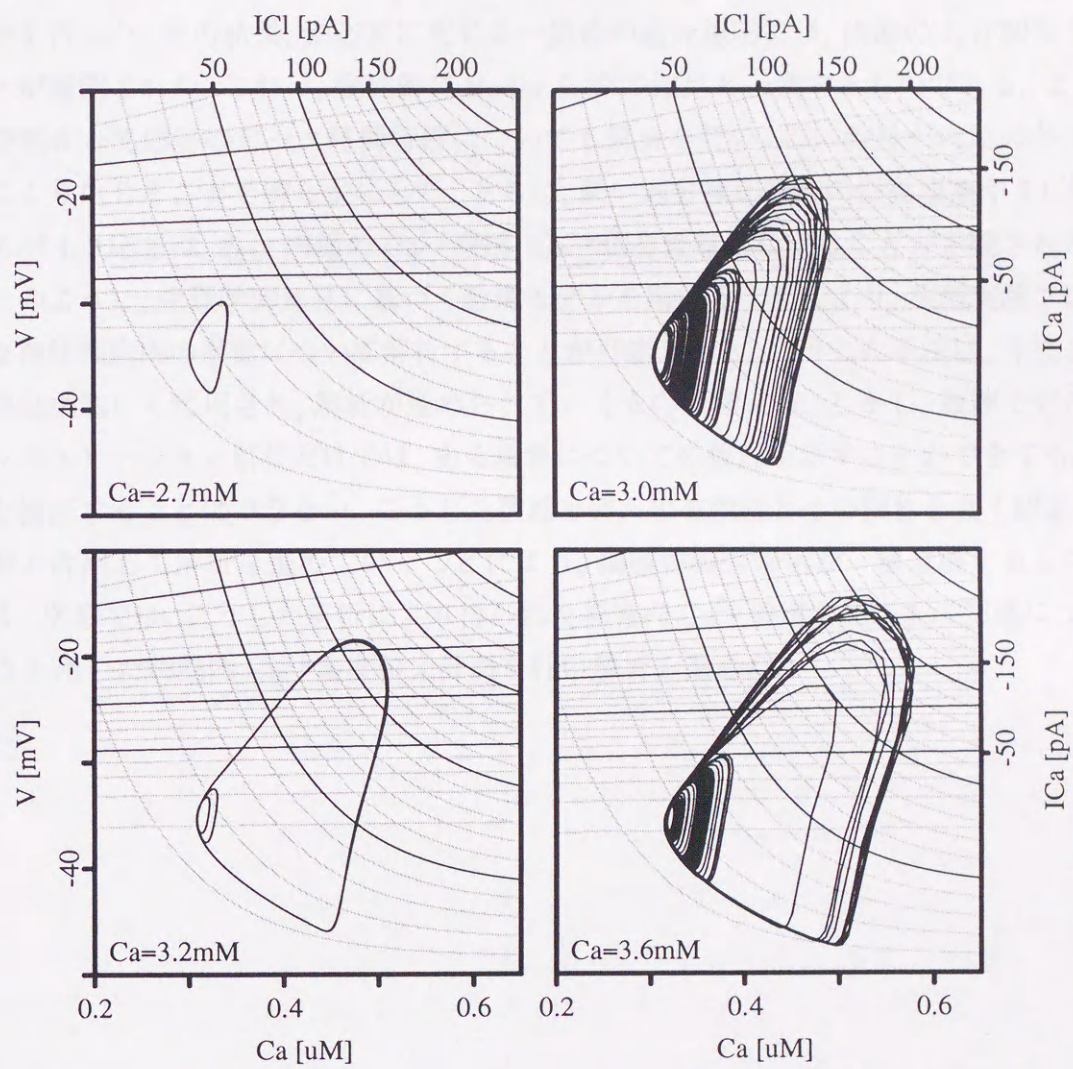


図 4.19 視細胞モデルの定常スパイク応答時の電位- Ca^{2+} 濃度特性

4.7 まとめ

本章では、視細胞内節モデルと Torre らの外節モデルを統合し、光受容から膜電位応答形成までの数理モデルの構築を行い、このモデルの妥当性を検討した。さらに、このモデルを用いて光感受性電流と内節の各イオン電流の修飾作用を明確にし、光応答生成メカニズムの解析を行った。その結果、光応答に生じる一過性の過分極応答は、内節の I_h が関与していることが確認された。これは、定性的に Bader ら^[25]の知見と一致するものである。また、光感受性電流と光応答のピーク時間特性についても解析を行い、この特性が内節の各イオン電流により生じることを明らかにした。さらに、長い過分極応答後の振動現象や TEA 混入時のスパイク応答は、 I_{Ca} 、内節の Ca^{2+} 機構、 Ca^{2+} 依存性電流によることが示唆された。

以上のように、生理学的知見に基づく数理モデルを用いることにより、生理実験では測定困難な神経細胞内の挙動について解析することが可能となる。こうした手法は、今後さらに他の神経細胞にも応用され、解析が進められていくものと考えられる。しかし、数理モデルを用いたシミュレーション解析だけでは、ある現象についての仮説を示すことができても、その現象を検証することはできない。こうした数理モデルの有効性とその限界を良く認識し、生理実験と併用して解析を進めていくことにより、網膜の機能解明が一層進展するものと思われる。次章では、こうした解析により得られた細胞内 Ca^{2+} 機構と光応答の関連について、Fura-2 を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度の光計測を行い解析を進めた。

第 5 章

網膜視細胞の細胞内 Ca^{2+} 機構の時空間特性の解析

5.1 はじめに

視細胞は光刺激を受容し光応答へと変換する、光センサの働きを担う感覚細胞である。前章では視細胞のイオン電流モデルを構築し、シミュレーションを行うことで、光応答時の各イオン電流や細胞内 Ca^{2+} 機構の働きを解析した。これにより、光応答の諸現象には、細胞内 Ca^{2+} 機構の関与が示唆された。さらに、外節の光変換機構においても、光応答に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化により、明・暗順応が生じる。このように、光応答の発生には細胞内 Ca^{2+} 機構の修飾作用が深く関与するため、光応答発生機構の解明を進める上で、細胞内 Ca^{2+} 機構の解析は必須事項であると考えられる。

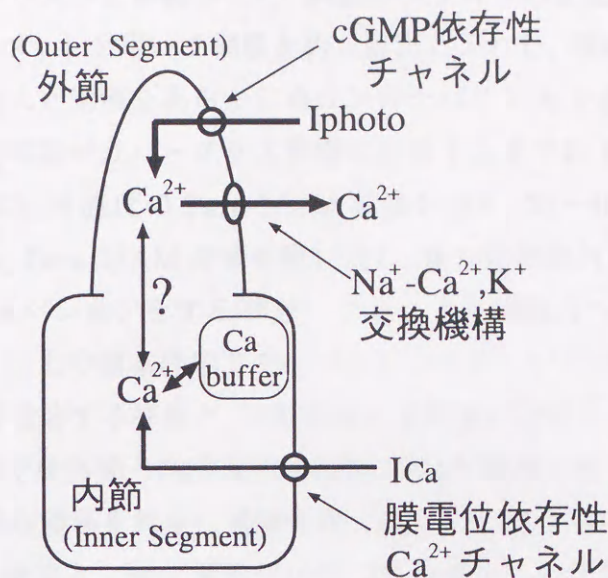
そこで本章では、 Ca^{2+} 指示薬 Fura-2 を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度の光計測を行い、単離視細胞の Ca^{2+} 濃度変化を時空間的に解析した。その結果、定常状態における視細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は、内節に比べて外節が高く、35 個の視細胞の平均では外節が $0.379\mu\text{M}$ で内節が $0.174\mu\text{M}$ であった。この濃度差は、細胞外の溶液から Ca^{2+} を除去することにより、内節と同一レベルにまで減少する。さらに、外節から内節への Ca^{2+} の拡散を調べるために、細胞外溶液の Na^+ を Li^+ へと置換し、 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}, \text{K}^+$ 交換機構を停止させた時の Ca^{2+} 濃度変化を測定したところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が外節から内節へと遅れて伝わり、その濃度上昇も外節で高く内節で低いことが確認された。同様に IBMX 灌流時にもほぼ同じ結果が得られた。こうした結果は、 Ca^{2+} が外節の cGMP 依存性チャネルを透過して細胞内へと流入し、これが内節へと拡散することを示唆している。そのため、外節と内節の細胞内 Ca^{2+} 機構は相互に作用しあうことが予想される。

次に、内節の膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの細胞内 Ca^{2+} 濃度への影響を調べた。膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは静止膜電位（約 $-30mV$ ）よりも脱分極側で活性化し、ほぼ $0mV$ で最大となる^[24]。そのため、細胞外溶液の K^+ 濃度を通常の $10\sim 20$ 倍まで増加することで膜電位を脱分極させ、 Ca^{2+} チャンネルを活性化し、この時の細胞内カルシウム濃度変化を調べた。この結果、 Ca^{2+} 濃度の上昇は内節と外節の双方でみられ、その大きさは内節のシナプス側で高く外節側で低いことが示された。さらにこの濃度上昇は、細胞外の Ca^{2+} を除去したときや Ca^{2+} チャンネルの選択的阻害剤である Nicadipine を灌流したときには見られないため、 Ca^{2+} チャンネルからの Ca^{2+} の流入であることが確認された。また外節と内節の濃度上昇の時間特性を比較したところ、各位置の濃度上昇はほぼ同時に引き起されることが確認され、膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの分布密度は、内節のシナプス側で高く外節側に行くに従い減少することが示唆された。こうした結果は、視細胞の細胞内カルシウム機構の特性を明確なものとし、その機能解明に重要な示唆を与えるだけでなく、光受容素子としての優れた視細胞の働きを生理学的な見地から解析し、工学的に応用する上で基礎となるものである。

5.2 実験の概要

視細胞の細胞内 Ca^{2+} 機構は、内節の膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルや細胞内 Ca^{2+} バッファ、外節の cGMP 依存性チャンネル、 Na^+-Ca^{2+}, K^+ 交換機構により構成されている。こうした細胞内 Ca^{2+} 機構の概念図を図 5.1 に示す。

これまでの視細胞に関する生理学的知見より、定常状態では外節の cGMP 依存性チャンネルを介して Ca^{2+} が外節内へと流入していることが示唆されている。従って、定常状態における視細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度分布は、外節で高く内節で低いことが予想される。そのため、まず定常状態における細胞内 Ca^{2+} 濃度の空間分布について調べ、外節と内節の Ca^{2+} 濃度の差が存在するかを確認した。さらにこの濃度差が何により生じるかを調べるため、 Ca^{2+} free 溶液を灌流し細胞外の Ca^{2+} を除去したときの Ca^{2+} 濃度変化について測定した。これにより細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下した場合は、細胞外からの Ca^{2+} の流入が考えられ、低下しない場合は細胞内 Ca^{2+} バッファなどからの継続的な Ca^{2+} の放出が考えられる。また、細胞外溶液を Na^+ から Li^+ へと置換し、 Na^+-Ca^{2+}, K^+ 交換機構を停止させた時の Ca^{2+} 濃度の上昇を調べることもによって、 Ca^{2+} の流入状況を把握することができる。しかし、これらの灌流実験だけでは、細胞内への Ca^{2+} の流入を示唆することはできても、それがどのチャンネルを介して流入しているかを特定することはできない。視細胞には、図 5.1 に示したように内節の膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルからも Ca^{2+} の流入が生じるため、cGMP 依存性チャンネル

図 5.1 視細胞の細胞内 Ca^{2+} 機構

を介した流入であることを特定するためには、このチャンネルに選択的に作用する薬物を灌流する必要がある。そこで、細胞内の cGMP 濃度を顕著に増加させる IBMX を灌流し、その時の Ca^{2+} 濃度変化について調べた。この灌流により、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が生じた場合は、cGMP 依存性チャンネルからの Ca^{2+} の流入が示唆される。

また、内節には膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが存在しており、光応答終了時の振動現象などに関与することが4章で示唆されている。そのため、このチャンネルを介した Ca^{2+} の流入とその影響を解析することは、シミュレーションの結果を裏付ける意味で必須と考えられる。膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは、脱分極応答により活性化されるため、high K^+ 溶液を灌流することにより膜電位を脱分極させ、その時の Ca^{2+} 濃度変化の測定を行った。さらに、この濃度変化が膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルによることを特定するため、このチャンネルの選択的阻害剤である Nicadipine の灌流実験などを行った。

5.2.1 実験標本の作成

本研究の実験は全て単離視細胞を用い、常温下（約 $20^{\circ}C$ ）で行った。視細胞は体長 20～25cm のコイより以下の操作を行い計測した。約2時間暗順応させたコイの眼球を摘出後、水晶体を含む前眼部を取り除いた眼胚標本を作成する。さらにこれを、millipore フィルタ上に乗せ網膜を剥離した。この剥離網膜を手術用メスを用いて約 2mm 角に切り分け、2ml

の細胞外液の入ったフラスコに移動させた。網膜がフラスコの管底に沈んだのを確認後、先端径が約 1.5mm のピペットを用いて網膜を約 5 回出し入れし、機械的に視細胞を単離させた^[51]。この視細胞を含んだ溶液をあらかじめコンカナバリン A を塗装後乾燥させたカバーガラス上に分注し、視細胞がカバーガラス表面に付着するまで約 10 分間待つ。その後、余分な溶液を取り除き 10 μ M 濃度の Fura-2/AM 溶液を加え、30~40 分間インキュベーションを行った。そのうち、Fura-2/AM 溶液を吸い出し、新たに細胞外液を 3 回程度交換し、約 30 分間ポストインキュベーションをする^{[52],[44]}。これにより細胞内へ Fura-2 がロードされ計測可能な状態となる。以上の標本作成までのプロトコルについては、図 5.2 に示した。なお、視細胞には微弱な光を受容する杆体と、比較的強い光刺激に反応し色覚に関与する錐体の 2 種類があるが、本実験では外節と内節双方の細胞内 Ca^{2+} 機構の解析を目的とするため、内節が大きく計測が容易な錐体を対象に実験を行った。また、インキュベーションに用いた細胞外液は、あらかじめ酸素と二酸化炭素が 95%、5% のガスにより 1 時間以上バブリングしたものを使用した。

5.2.2 実験の溶液

実験には、以下の組成の溶液を使用した。通常の細胞外溶液: 102 NaCl, 2.6 KCl, 1 MgCl₂·6(H₂O), 28 NaHCO₃, 5 Glucose, 1 CaCl₂ (単位は全て mM)。Fura-2/AM 溶液: 細胞外溶液 1ml に対して 1mM の DMSO 溶液 Fura-2/AM を 10 μ l 加え良く拡散させたものを使用。Ca²⁺ free 溶液: 細胞外溶液作成時に CaCl₂ を加えず、2mM の EGTA を加えた。Li⁺ 溶液: 細胞外溶液の NaCl を等濃度の LiCl に置き換えた。high K⁺ 溶液: 細胞外溶液の KCl を 22.6mM にしたものを使用。IBMX 溶液: 細胞外溶液に 0.5mM の IBMX を加えた。Nicadipine 溶液: 細胞外溶液に 10 μ M の Nicadipine を加えた。なお本実験では、これらの溶液を酸素と二酸化炭素が 95%、5% のガスにより常時バブリングして使用した。

5.2.3 測定装置と実験系

本実験では、正立型顕微鏡 (Nikon Optiphot-2) に 40 倍の水浸対物レンズ (Zeiss 製) を使用し計測を行った。蛍光分布の測定は ICCD カメラを用い、340nm と 380nm の励起光を交互に照射させ、それぞれの蛍光像を 1/30 秒で取り込んだ。取得した画像データは 16 枚加算平均し、それぞれの強度比から Ca²⁺ 濃度を求めた。Ca²⁺ 濃度を求める時に使用したキャリブレーションカーブは、ionomycin と Mn²⁺ を灌流させて蛍光強度比の最小値と最大値を計測し、理論式より算出した^[53]。こうした基本的な処理は全て ARGUS 50 上において

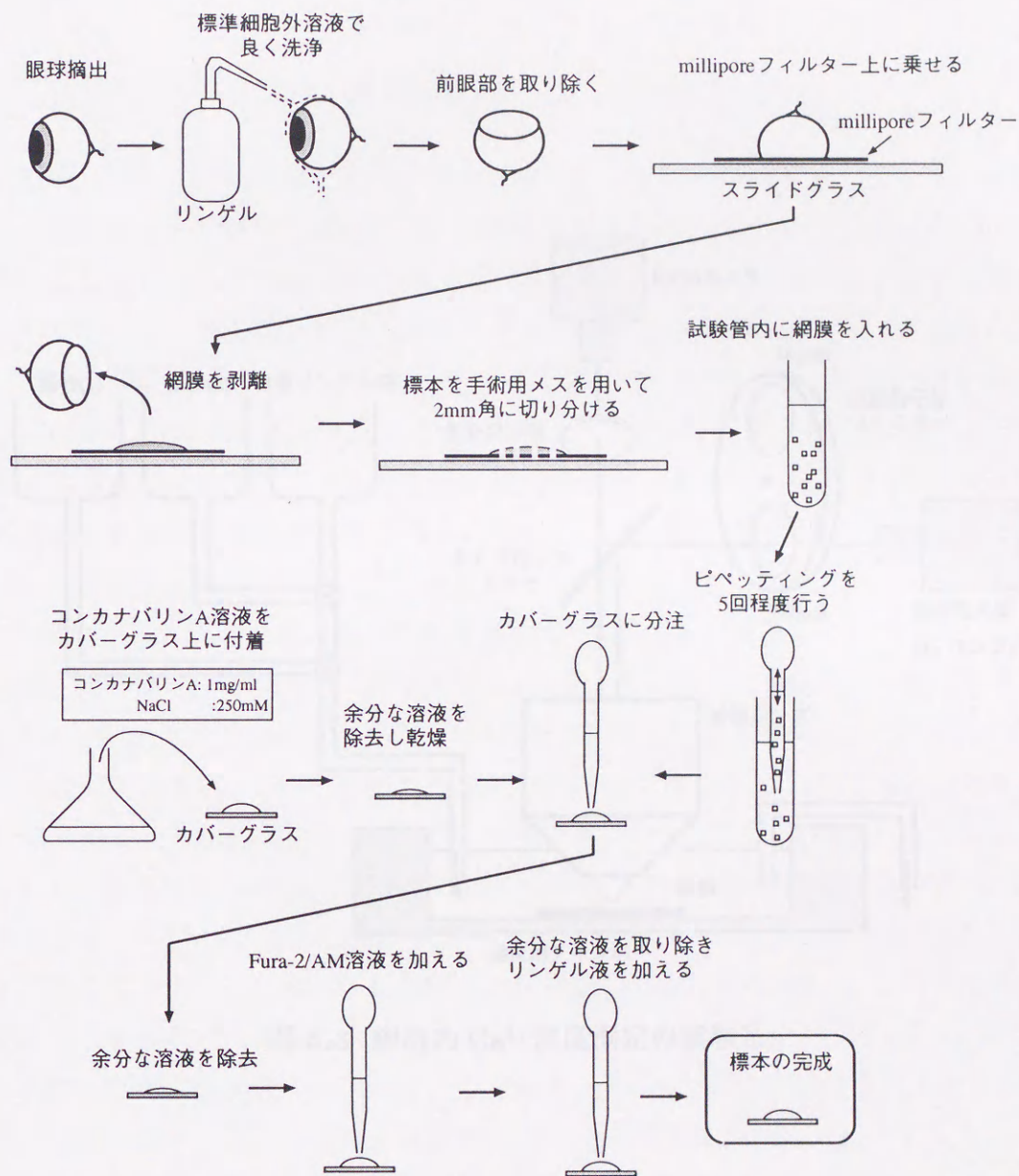


図 5.2 標本作成のプロトコル

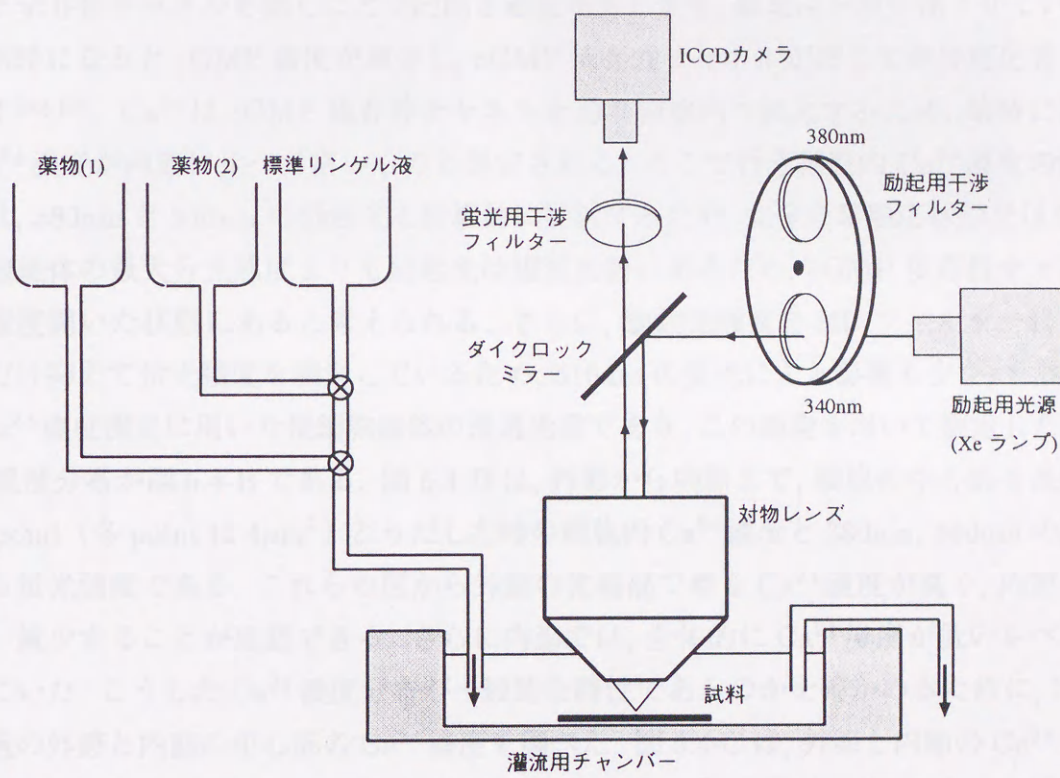


図 5.3 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定の実験系

行った。

実験中は絶えず細胞外溶液を灌流させ、実験目的に応じて各種溶液に切替えた。灌流は、各種溶液の入った容器を計測用チャンバーより高所におき、重力による自然灌流とした。こうした実験系の構成図を図 5.3 に示した。

5.3 定常状態における細胞内 Ca^{2+} 濃度の分布

視細胞は、外節の cGMP 依存性チャネルの開閉により光応答を形成している。暗時には、cGMP 依存性チャネルを開くことで内向き電流を生じさせ、膜電位を脱分極させている。これが明時になると cGMP 濃度が減少し、cGMP 依存性チャネルが閉じて過分極応答を引き起こす^{[54], [55]}。 Ca^{2+} は cGMP 依存性チャネルを通り細胞内へ流入するため、暗時には外節の Ca^{2+} 濃度が内節に比べて高いものと想定される。ここで行う細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定実験では、380nm と 340nm の励起光を断続的に照射するため、完全な暗順応状態ではないが、視細胞錐体の最大分光感度よりも励起光は短波長側にあるため、cGMP 依存性チャネルはある程度開いた状態にあると考えられる。さらに、励起光強度を ND フィルターによりできるだけ抑えて蛍光強度を測定しているため、510nm の蛍光による影響も少ない。図 5.4-A は、 Ca^{2+} 濃度測定に用いた視細胞錐体の透過光像であり、この細胞を用いて測定した細胞内 Ca^{2+} 濃度分布が図 5.4-B である。図 5.4-D は、外節から内節まで、細胞の中心部を長軸方向に 20point (各 point は $4\mu m^2$) とりだした時の細胞内 Ca^{2+} 濃度と 380nm, 340nm の励起光による蛍光強度である。これらの図から外節の先端部で最も Ca^{2+} 濃度が高く、内節に行くに従い減少することが確認できる。さらに内節では、全体的に Ca^{2+} 濃度が低いレベルに保たれていた。こうした Ca^{2+} 濃度分布が一般的な特性であるのかを確かめるために、35 個の視細胞の外節と内節の中心部の Ca^{2+} 濃度を調べた。図 5.4-C は、外節と内節の Ca^{2+} 濃度のヒストグラムであり、この図からも内節よりも外節の Ca^{2+} 濃度が高く、こうした特性が全ての視細胞に共通に見られることが確認された。また、外節と内節の Ca^{2+} 濃度の平均はそれぞれ 0.379 と $0.174\mu M$ であった。しかしながら、図 5.4-D の蛍光強度を見ると、外節の蛍光強度が内節に比べて弱く、微弱な自家蛍光やノイズの影響が内節に比べて大きいことが懸念される。そこで、この Ca^{2+} 濃度の偏りが細胞外からの Ca^{2+} の流入であることを確かめるため、細胞外溶液を Ca^{2+} free 溶液に切り変えた時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。

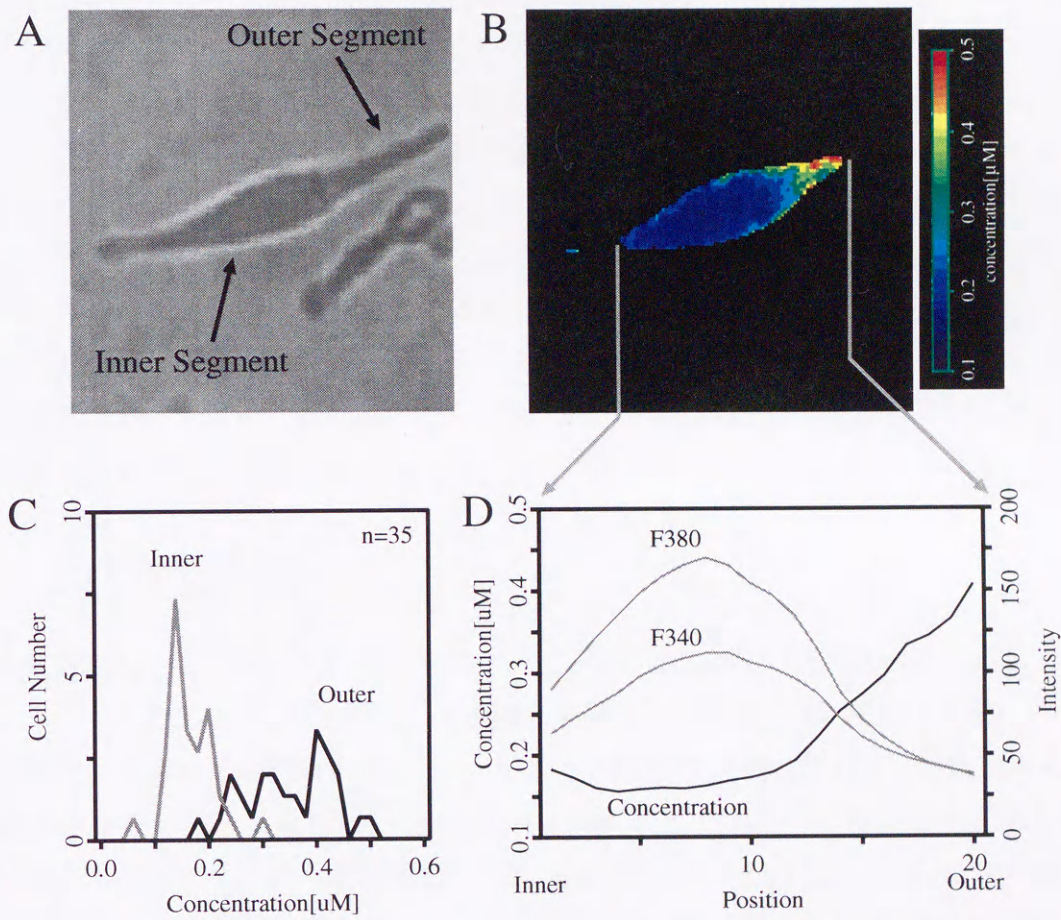


図 5.4 定常状態における視細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の空間分布.

A: 測定に使用した視細胞の透過光像, B: 細胞内 Ca^{2+} 濃度の分布, C: 35 個の細胞の内節と外節の濃度, D: 内節から外節にかけての Ca^{2+} 濃度と蛍光強度

5.4 Ca^{2+} free 溶液灌流実験

図 5.5-A は、外節と内節およびその中間位置における Ca^{2+} free 時の濃度変化を示したもので、測定開始より 30sec から 90sec まで 60 秒間溶液を灌流している。測定開始時には、外節の Ca^{2+} 濃度が約 $0.25\mu M$ で内節が約 $0.1\mu M$ であった。これが Ca^{2+} free 溶液に切り変わるに従い、外節の Ca^{2+} 濃度が顕著に減少し、120sec ではほぼ外節と内節が同じになる。再度 Ca^{2+} free 溶液から標準細胞外溶液に切り換えると、外節と内節の濃度差は測定開始時と同様になる。なお、灌流後に見られる内節のスパイク状の濃度上昇は、外節の Ca^{2+} 濃度の減少に伴う光感受性電流の増加が脱分極を引き起こし、膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを活性化するために生じると考えられる。図 5.5-B は、同一の細胞を外節から内節まで長軸方向に 20 点データを取りだし、横軸を計測位置、縦軸を Ca^{2+} 濃度とした時の各時刻の空間濃度変化を示したものである。測定開始から 60sec と 75sec では外節の Ca^{2+} 濃度が高いため、グラフは左上がりとなっているが、細胞外の Ca^{2+} 濃度が減少するに伴い全体の濃度が減少しほぼ並行になる。こうした結果は、定常状態における細胞外から外節内への Ca^{2+} の流入を示唆するものと考えられる。

5.5 Li^{+} 灌流実験

定常状態において、細胞外から外節内への Ca^{2+} の流入が存在するならば、細胞外溶液を Na^{+} から Li^{+} へ置換し Na^{+} - Ca^{2+} , K^{+} 交換機構を停止させた時には、外節での顕著な濃度上昇が観測されるものと期待される。また、外節と内節が空間的に連続で、外節から内節への Ca^{2+} の拡散が生じているならば、外節の濃度上昇が遅れて内節へ伝わるのが考えられる。これを確かめるため Li^{+} 置換実験を行った。図 5.6 は、外節と内節、およびその中間位置における Li^{+} 置換実験の結果である。 Li^{+} 溶液の置換は、測定開始から 60~90sec までと 180~240sec までの 2 回行った。 Li^{+} 置換時の外節の Ca^{2+} 濃度は、 $0.4\mu M$ から $0.8\mu M$ まで顕著な上昇を示すが、内節の Ca^{2+} 濃度はそれほど大きな変化を見せない。また、外節と内節の Ca^{2+} 濃度の時間変化は、外節で速く内節でスローであり、ピークに達する時間も、内節よりも外節が約 15sec ほど早い。こうした現象をより詳細に解析するため、外節と内節の Ca^{2+} 濃度の時空間変を示したものが図 5.7 である。この図の横軸は、測定時間で縦軸は外節から内節までの各 20point の位置を示している。 Ca^{2+} 濃度変化は、青から赤までの色の変化で示した。また、図中の赤い四角は、 Li^{+} 置換時のピーク Ca^{2+} 濃度の位置を示す。この図より、 Li^{+} 置換時には外節の Ca^{2+} 濃度が急激に上昇し、それが内節へ遅れて拡散する様子が良

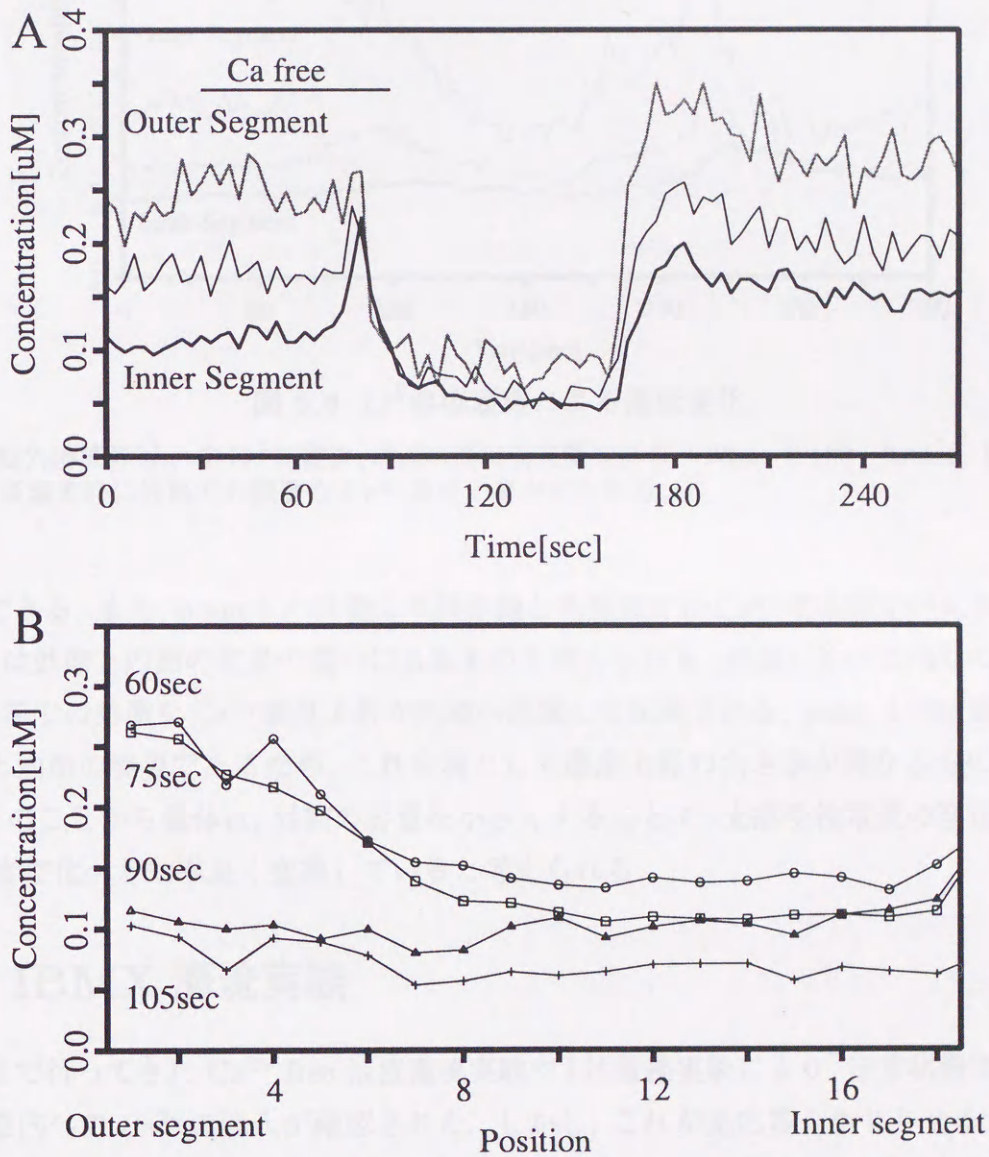


図 5.5 Ca^{2+} free 溶液灌流による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化.

A: 外節と内節, 中間位置における Ca free 溶液灌流時の Ca^{2+} 濃度変化, B: 外節から内節にかけての Ca^{2+} 濃度の時間推移

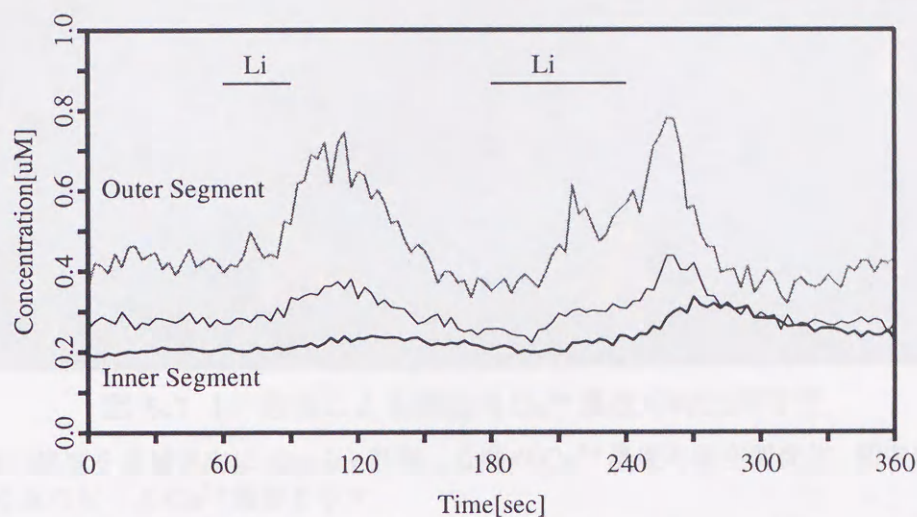


図 5.6 Li^+ 溶液灌流による濃度変化.

細胞外溶液の Na^+ を Li^+ に置換, 灌流時間は測定開始後 60~90sec と 180~240sec. Li^+ 溶液灌流時に外節での顕著な Ca^{2+} 濃度上昇が見られる.

く確認できる. また, point 5 の位置より外節側と内節側では Ca^{2+} 濃度変化が大きく異なるが, これは外節と内節の容量の違いによるものと考えられる. 外節に比べて内節の容量は大きく, 外節での急激な Ca^{2+} 濃度上昇が内節へ減衰して伝達される. point 5 の位置はちょうど外節と内節の境界であるため, これを境として濃度上昇の大きさが異なるものと考えられる. このことから錐体は, 外節の容量を小さくすることで, 光感受性電流の変化を細胞内 Ca^{2+} 濃度変化へと効率良く変換していると考えられる.

5.6 IBMX 灌流実験

これまで行ってきた Ca^{2+} free 溶液灌流実験や Li^+ 置換実験により, 定常状態では細胞外から外節内への Ca^{2+} の流入が確認された. しかし, これが光応答を生じさせる cGMP 依存性チャネルによるものかどうかは, まだ確認できていない. そこで, 光感受性電流を顕著に増加させる IBMX 灌流実験を行い, その時の濃度変化について解析を進めた. IBMX は cGMP を加水分解させる PDE の働きを阻害するため, 細胞内の cGMP 濃度が上昇し cGMP 依存性チャネルを活性化させる. そのため, もしこのチャネルを通して Ca^{2+} が流入しているならば, IBMX 灌流時に外節での急激な Ca^{2+} 濃度上昇が生じると期待される.

図 5.8 は 0.5mM の IBMX と Nicadipine(10 μ M) + IBMX (0.5 mM) を灌流した時の Ca^{2+}

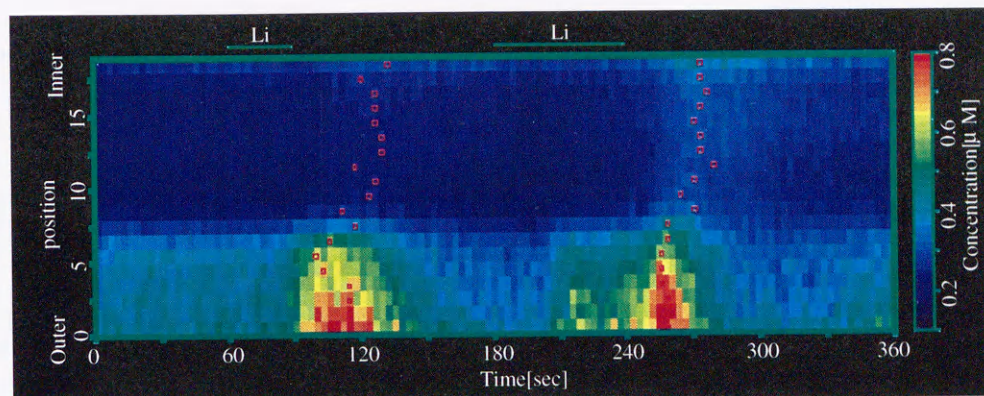


図 5.7 Li^+ 溶液による細胞内 Ca^{2+} 濃度の時空間特性.

図 5.6 の細胞を長軸方向に 20point 計測した時の Ca^{2+} 濃度の時空間変化. 図中の四角は各位置のピーク Ca^{2+} 濃度を示す.

濃度変化を示したものである. IBMX の灌流は測定開始より 60sec から 75sec までと, Ca^{2+} チャンネルの阻害剤である Nicadipine 灌流下で 360sec から 390sec までの 2 回行った. 通常溶液から IBMX を灌流した場合には, 外節での急激な Ca^{2+} 濃度上昇が見られた. しかし, 内節の濃度変化は外節に比べて非常に小さく, そのほとんどは膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと外節からの拡散によるものと考えられる. 次に, 240sec から Nicadipine を灌流し, その存在下で IBMX を灌流させた. この時も IBMX だけの場合と同様に, 外節での顕著な濃度上昇と内節での微小な濃度上昇が確認された. この状態では, 内節の膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは阻害されており, 細胞内への Ca^{2+} の流入は cGMP 依存性チャンネルのみによるものと考えられる. 従って, IBMX 灌流による濃度上昇は, cGMP チャンネルによることが示唆された. このことから定常状態では, Ca^{2+} が cGMP 依存性チャンネルを透過し, 外節内へと流入していることが考えられ, これにより外節の Ca^{2+} 濃度が内節に比べて高い状態を維持しているものと思われる.

5.7 内節の膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの影響

これまでの実験では, 外節の cGMP 依存性チャンネルから流入した Ca^{2+} が内節へ拡散する様子について解析を行ってきた. しかし, 視細胞内節にも Ca^{2+} を流入させる膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが存在しており, このチャンネルが内節および外節に与える Ca^{2+} 濃度変化に対しても解析を行った. 内節の膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは, 静止膜電位よりも脱分極側で活性化し, 約 0mV で最大となる. そこで, 高濃度のカリウム溶液 (high K^+ , 42.6 mM, 32.6

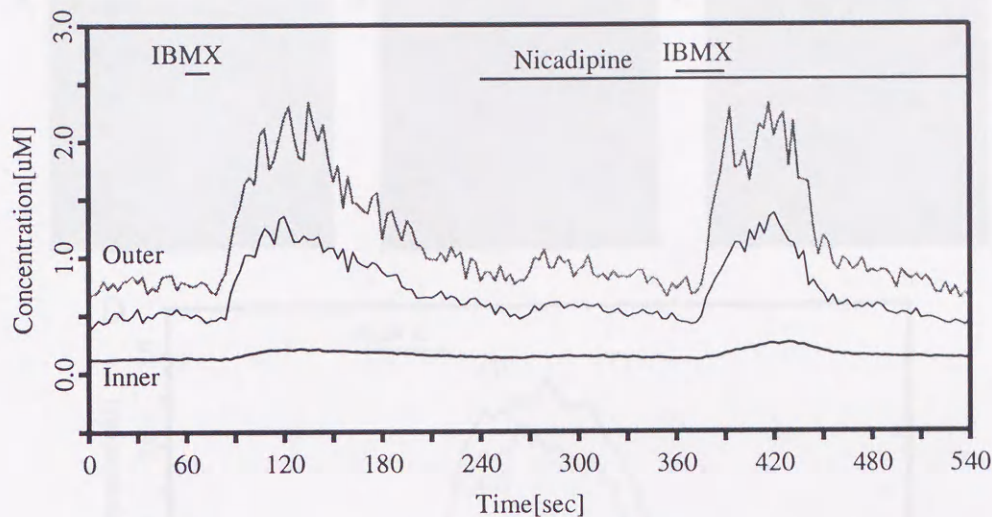


図 5.8 IBMX 灌流による外節と内節の Ca^{2+} 濃度変化.

0.5mM の IBMX 灌流による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化. 灌流時間は, 測定開始後 60sec ~75sec と Nicadipine 存在下で 360~390sec. それぞれの IBMX 灌流時に外節の細部内 Ca^{2+} 濃度が顕著に増加する.

mM の K^+ 濃度) を灌流し, 膜電位を脱分極させた時の Ca^{2+} 濃度変化を測定した. 図 5.9-A は high K^+ 溶液灌流実験に用いた視細胞の透過像を示しており, ここで測定した視細胞は 2 個の視細胞が隣接している double cone である. 図 5.9-B はこの細胞の測定開始時の Ca^{2+} 濃度分布と経時変化の測定位置を示している. 経時変化の測定は, 内節が球状の視細胞の外節 (1) と内節 (3), さらに外節と内節の境界付近 (2) の 3 箇所とし, high K^+ 溶液の灌流は測定開始より 60sec から 90sec までの 30 秒間行った. この各位置の Ca^{2+} 濃度変化は, 図 5.9-D のようになった. 外節の Ca^{2+} 濃度変化は, 内節に比べて小さく, ほぼ $1/3$ であった. さらに外節と内節の境界付近では, ほぼ外節と内節の中間的な濃度変化となる. 図 5.9-C は, high K^+ により Ca^{2+} 濃度が上昇した 120sec 時の濃度分布を示している. この図より, high K^+ 灌流により, 内節全体が約 $0.1\mu M$ から約 $2.5\mu M$ まで上昇するのに対して, 外節での上昇はかなり低いことが確認できる. この結果は, 内節の膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルより流入した Ca^{2+} が外節へ拡散したことを示すものと考えられる. しかし, high K^+ 灌流による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の要因としては, 細胞内 Ca^{2+} バッファからの放出や他のチャネルからの流入などが考えられるため, この濃度上昇が何により生じたかを特定する必要がある. そこで, まずこの濃度上昇が細胞外からの Ca^{2+} の流入によるものか, 細胞内からの放出によるものかを確認するために, Ca^{2+} free 溶液灌流時の high K^+ の影響について調べた. これが

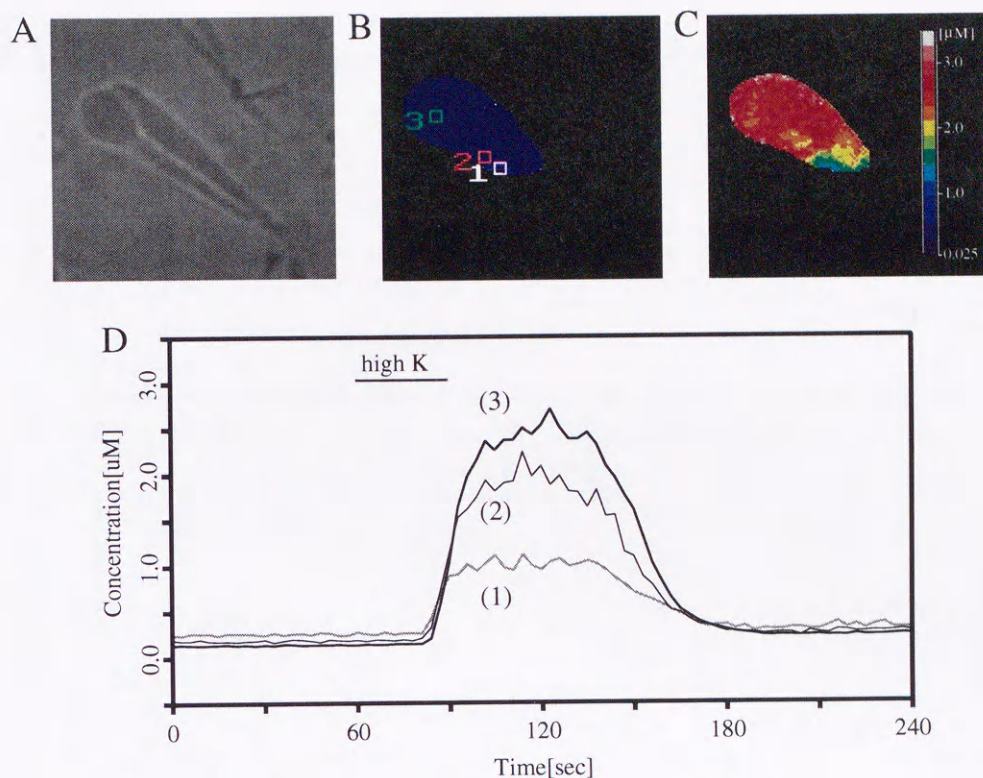


図 5.9 高カリウム溶液灌流時の濃度変化

A: 計測した視細胞の透過光像, B: 測定開始時の Ca^{2+} 濃度分布と Ca^{2+} 濃度測定位置, C: high K^+ 溶液の灌流により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した時の Ca^{2+} 濃度分布 (120sec 時), D: B 図の各測定位置の経時変化.

図 5.10-A である. Ca^{2+} free 溶液の灌流は測定開始より 30sec から 135sec までで, この間の 75sec から 90sec までの 30 秒間 high K^+ 溶液を灌流させた. この時には, 内節, 外節ともに細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇は全く見られなかった. 次に, Ca^{2+} free 溶液を通常溶液に切替えた後, 同様に high K^+ 溶液を灌流したところ, 顕著な Ca^{2+} 濃度上昇が観測された. このことは, high K^+ 溶液による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が細胞外からの Ca^{2+} の流入によることを示唆している. しかしながら, Ca^{2+} バッファからの Ca^{2+} 濃度依存性の放出に関する実験は行っていないため, 今後はこの点について解析を進める必要がある.

こうした細胞外からの Ca^{2+} の流入が膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルからのものかを調べるため, Nicadipine 灌流下における high K^+ の影響について実験を行った. これが図 5.10-B である. Ca^{2+} 濃度の経時変化は, 外節, 内節および外節と内節の境界付近の 3 点とした. high K^+ 溶液の灌流は, 測定開始より 30sec から 45sec までの 15 秒間と Nicadipine 灌流後の 330sec

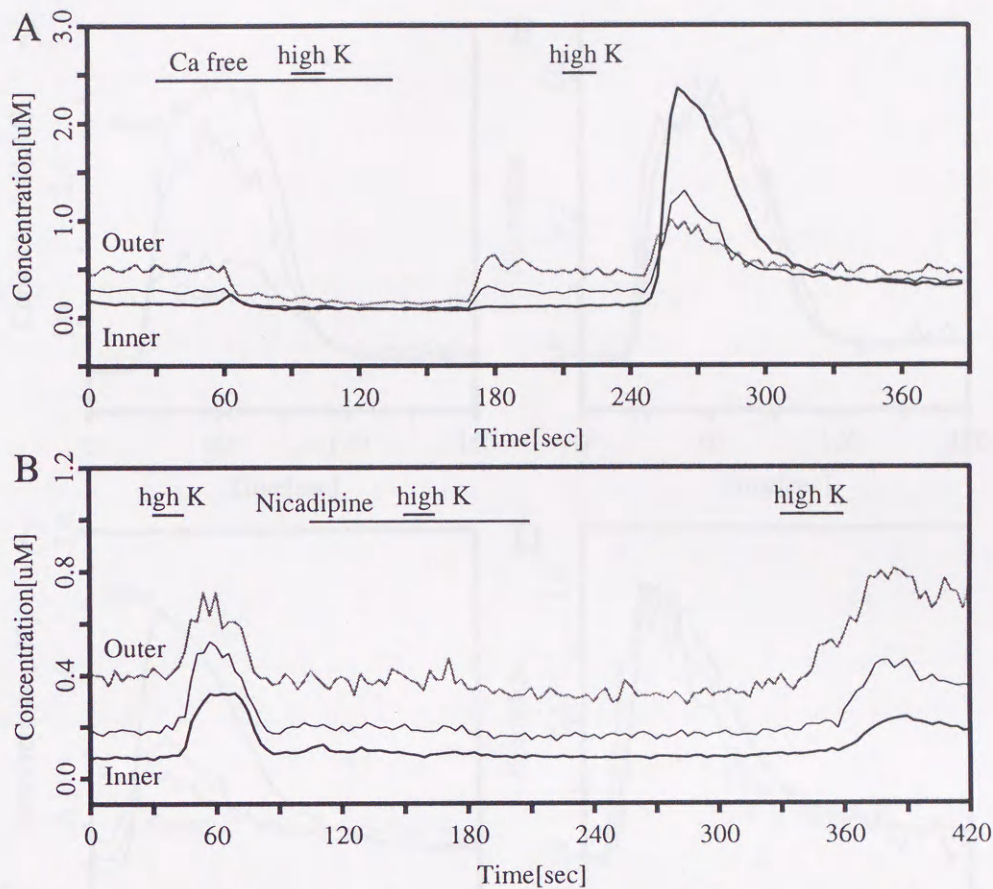


図 5.10 Ca^{2+} free 溶液と Nicadipine 溶液灌流時の高カリウム溶液の影響。

A: Ca^{2+} free 溶液 (0 Ca^{2+} , 2mM EGTA) 灌流下における high K 溶液の影響。 B: Nicadipine 存在下における high K 溶液の影響。

から 360sec までの 2 回行った。また、Nicadipine の灌流は 90sec から 210sec までで、この間の 150sec から 165sec までの 15 秒間は high K^{+} + Nicadipine 溶液を灌流した。始めの high K^{+} 溶液の灌流では細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられたが、Nicadipine 灌流下では全く濃度上昇が観測されなかった。さらに Nicadipine 溶液を wash out 後、再度 high K^{+} 溶液を灌流させた時には、同様の濃度上昇が見られた。このように、Nicadipine による顕著な阻害作用が確認されたことで、この濃度上昇は膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルによることが示された。

次に、high K^{+} 灌流時の各位置における Ca^{2+} 濃度を正規化し比較を行った。図 5.11-A, C は、図 5.9-D と図 5.10-A の high K^{+} 灌流時の濃度変化を切り出したもので、これらを正規化したものが図 5.11-B, D である。図中の実線は内節の濃度変化であり、薄線は外節のものである。この図から、外節、内節ともに、ほぼ同時に濃度上昇や減少が引き起こされている

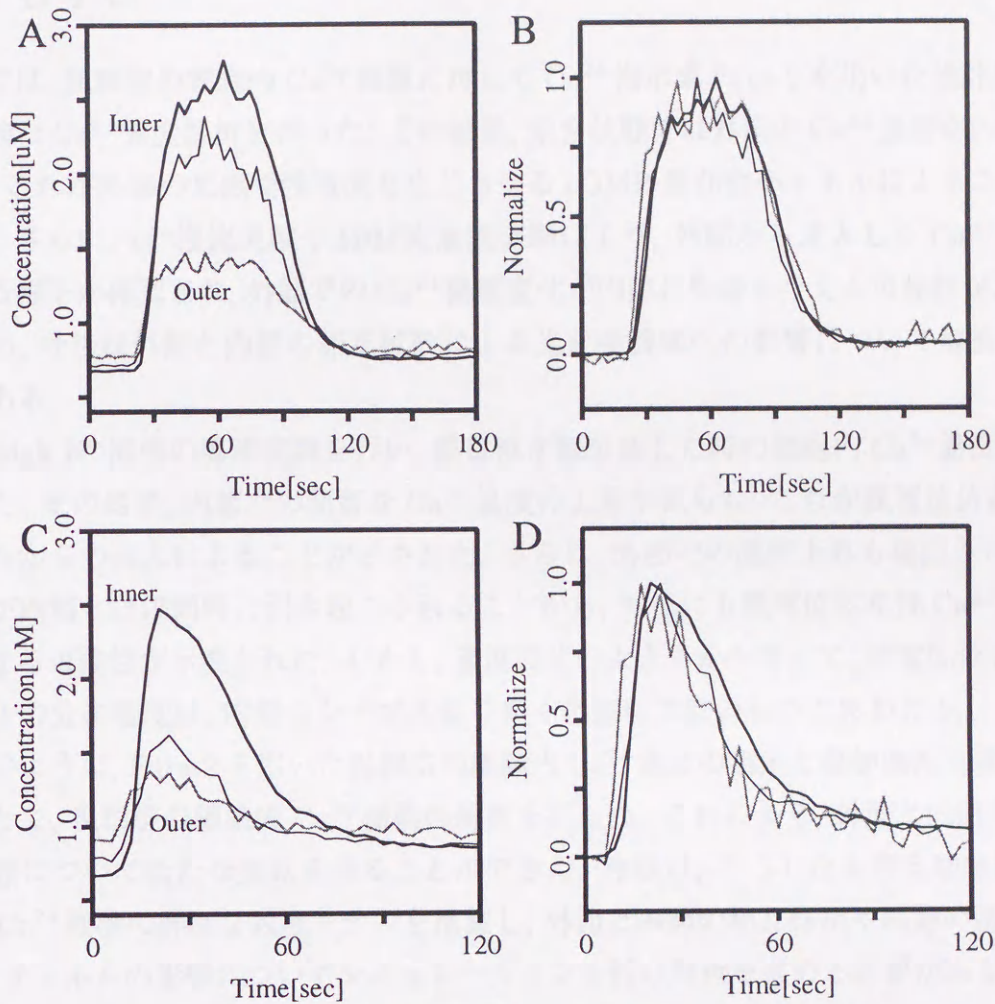


図 5.11 高カリウム溶液灌流時の Ca^{2+} 濃度変化の正規化.

ことが分かる. このことは, 外節での濃度上昇が内節からの拡散によるものではなく, 外節の Ca^{2+} チャンネルからの流入によるものと考えられるが, 外節に膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが存在すると言う生理学的知見は無いため, 今後より詳細な実験や解析が必要である. しかし, 外節と内節の濃度変化の大きさから考えて, 外節に膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが存在していたとしても, その分布密度はかなり低いものと思われる. こうしたことから膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの分布は, 内節のシナプス側で高く, 外節側で低いことが示唆された.

5.8 むすび

本章では、視細胞の細胞内 Ca^{2+} 機構に対して Ca^{2+} 指示薬 Fura-2 を用いた光計測を行い、時空間的な Ca^{2+} 濃度解析を行った。その結果、定常状態では外節の Ca^{2+} 濃度が内節に比べて高く、これが外節の光感受性電流を生じさせる cGMP 依存性チャネルによることが示唆された。さらに、 Li^+ 灌流実験や IBMX 灌流実験により、外節から流入した Ca^{2+} が内節へ拡散する様子が確認され、外節での Ca^{2+} 濃度変化が内節に影響を与える可能性が示された。そのため、今後は外節と内節の相互拡散による光変換機構への影響について解析を進める必要がある。

次に high K^+ 溶液の灌流実験を行い、膜電位が脱分極した時の細胞内 Ca^{2+} 濃度について測定した。その結果、内節での顕著な Ca^{2+} 濃度の上昇が見られ、これが膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルからの流入によることが示された。さらに、外節での濃度上昇も確認され、この濃度変化が内節とほぼ同時に引き起こされることから、外節にも膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルが存在する可能性が示唆された。しかし、濃度変化の大きさから考えて、膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルの分布密度は、内節のシナプス側で高く外節側で低いものと思われる。

以上のように、Fura-2 を用いた視細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定と薬物灌流実験を組み合わせることで、視細胞の細胞内 Ca^{2+} 機構の解析を行った。これにより、外節と内節の Ca^{2+} の相互拡散について新たな知見を得ることができた。今後は、こうした生理実験結果を基に、細胞内 Ca^{2+} 機構の詳細な数理モデルを構築し、外節と内節の相互作用や内節の膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルの影響についてシミュレーションを行い解析を進める必要があるものと考えられる。

第 6 章

結論

網膜視細胞は、視覚系を構成する各種の神経細胞の中でも最も初期の情報処理を担う細胞であり、その光刺激を膜電位応答へと変換する光変換機構に関しては古くから多くの研究者の関心を集め、電気生理学、生化学、心理物理学などの諸分野から精力的な研究が進められてきた。こうした電気生理学や生化学などの分析的手法を用いることで、光変換機構を構成する各種タンパク質の構造や機能、イオンチャネルの働きなどの詳細な解析が進められている。しかしながら、生理実験などにより得られた結果は、細胞が本来機能する状態とは異なる、ある限定された条件下におけるものであり、これらの結果のみから複雑なシステムとしての光変換機構の全体像を浮き彫りにすることは困難である。そのため最近では、電気生理学や生化学などの生理学的知見を基に数理モデルを構築し、シミュレーションにより神経細胞全体としての機能を解析する構成的手法が用いられつつある。本研究においても、こうした手法を用いて視細胞の特性の解析を進めた。

第 3 章では、視細胞内節に存在するイオン電流モデルの種類とその特性について、これまでの生理学的知見を基に検討し、それぞれのイオン電流のモデル化を行った。視細胞内節には、Bader らや Maricq らにより 3 種類の膜電位依存性電流と 2 種類の Ca^{2+} 依存性電流が確認されており、各イオン電流の $I-V$ 特性や時間特性は、膜電位固定実験により明らかにされている。こうした生理学的知見をもとに膜電位依存性電流である、 I_{Ca} 、 I_{Kv} 、 I_h に関しては、Hodgkin-Huxley モデルの構造に従いモデル化を行った。さらに、 Ca^{2+} 依存性電流に関しては、細胞内の Ca^{2+} 濃度に依存して特性が変化するため細胞内 Ca^{2+} 機構のモデルが必要となる。ここでは、内節よりも研究が進んでいる、視細胞外節や心筋細胞の生理学的知見を参考として細胞内 Ca^{2+} 機構のモデルを構築した。こうした全てのイオン電流モデルを統合し、膜電位固定実験に対応するシミュレーションを行ったところ、生理実験データとの

定性的な一致が得られた。さらに、膜電流固定時のスパイク応答に対応するシミュレーションにより、このスパイク応答に関与するイオン電流成分の解析が可能となった。その結果、スパイク応答は I_{Ca} と Ca^{2+} 依存性電流、 I_{Kv} により形成されることが示唆された。

第4章では、光応答時の内節の各イオン電流や細胞内 Ca^{2+} 機構の働きを解析するため、3章で構築した内節のイオン電流モデルと Torre らが構築した視細胞外節の光変換機構のモデルを統合し、視細胞モデルの構築を行った。これにより、光刺激の受容から膜電位応答までのシミュレーションが可能となり、光応答に伴う内節の各イオン電流の働きを明確にすることができた。その結果、光応答初期の一過性過分極応答は I_h により生じることが示唆された。さらに、光応答終了後に見られる振動現象やスパイク現象が内節の I_{Ca} 、 $I_{Cl(Ca)}$ 、細胞内 Ca^{2+} 機構の相互作用により生じることが示唆された。こうした結果は、生理学的知見を取り入れた数理モデルによりはじめて得られたものであり、光応答時の各イオン電流の働きを生理実験のみで解析することは困難である。そのため今後は、神経細胞の解析を進める上でより数理モデルの重要性が増すものと考えられる。

第5章では、4章で示唆された光応答に対する細胞内 Ca^{2+} 機構の役割を解析するため、 Ca^{2+} 感受性色素 Fura-2 を用いた単離視細胞の光計測を行った。現在まで視細胞の細胞内 Ca^{2+} 機構については、まだ良く解明されていない部分が多くあるため、本章では基礎データとなる細胞内 Ca^{2+} 濃度の空間分布や外節の cGMP 依存性チャネルの働き、膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルや Na^+-Ca^{2+} 、 K^+ 交換機構の影響などについて解析を進めた。その結果、定常状態では、外節の Ca^{2+} 濃度が内節に比べて高く、これが細胞外から外節内への cGMP 依存性チャネルによる Ca^{2+} の流入により生じることが示唆された。さらに、内節の膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルによる Ca^{2+} 濃度上昇についても高カリウム溶液灌流実験を行い、チャネルの分布密度などの解析を進めた。

以上のように本研究では、視細胞の生理学的知見に従う数理モデルを構築し、光応答の発生に関与する各イオン電流や細胞内 Ca^{2+} 機構の働きを解析した。さらに、現在まで十分な生理学的知見のない視細胞内 Ca^{2+} 機構を調べるため、Fura-2 を用いた光計測を行い、その時空間特性を解析した。こうした視細胞の光受容から光応答形成に関わるメカニズムの研究を進めることで、視細胞の有する高感度・広帯域、適応性などの優れた特性の解明に結び付き、より高度で柔軟な処理を行う光センサの開発に継るものと考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切なる御指導を賜った、豊橋技術科学大学情報工学系 臼井支朗教授に心から深く感謝の意を表します。

日頃より有益なる御指導、御討論を賜った、情報処理センター 神山齊己助手、生理学研究所 石井宏幸助手に深く感謝致します。

細胞内 Ca^{2+} 機構について有益なる御助言、御指導を賜った、東京大学文学部心理学研究室 立花政夫教授に深く感謝致します。

本論文をまとめるにあたり、有益な御討論、御助言を頂いた豊橋技術科学大学電気電子工学系 米津宏雄教授、情報工学系 宇野洋二教授に深く感謝致します。

生理実験について御討論、御助言を頂いた河合房夫博士(現 生理学研究所)に深く感謝致します。

戸田尚宏助教授、中内茂樹助手、池野英利博士(現 舞鶴工業高等専門学校 助教授)、石原彰人君、青山俊弘君はじめ、生体情報工学研究室の諸氏には惜しめない御指導、御協力を頂き、ここに深く感謝致します。

参考文献

- [1] Dowling J. E. : "The retina an approachable part of the brain". The Belknap press of Harvard University press, (1987).
- [2] Nilsson S. E. G. : "An electron microscopic classification of the retina receptors of the leopard frog (*rana pipens*)". *J. ultrastruct. Res.*, Vol. 10, pp. 390-416, (1964).
- [3] Brovijagin V. L., Ivanina T. A., and Moshkov D. A. : "The ultrastructural organization of the photoreceptor membranes and the intradisc spaces of experimental treatments". *Vision. Res.*, Vol. 13, pp. 745-752, (1973).
- [4] 齊藤建彦. : "網膜における二次ニューロンの情報処理の概説". 視覚の分子メカニズム (蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊 4), Vol. 34, pp. 631-641, (1989).
- [5] Tamura T., Nakatani K., and Yau K-W. : "Calcium feedback and sensitivity regulation in primate rods". *J. Gen. Physiol.*, Vol. 98, pp. 95-130, (1991).
- [6] Forti S., Menini A., Rispoli G., and Torre V. : "Kinetics of phototransduction in retinal rods of the newt *triturus cristatus*". *J. Physiol.*, Vol. 419, pp. 265-295, (1989).
- [7] 河村悟. : "視細胞における順応調節蛋白質". 生物物理, Vol. 32, No. 4, pp. 12-17, (1992).
- [8] 津田基之. : "G 蛋白質とロドプシンとの相互作用". 視覚の分子メカニズム (蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊 4), Vol. 34, pp. 546-556, (1989).
- [9] 中谷敬. : "視細胞における情報処理". 実験医学, Vol. 11, No. 10, pp. 217-222, (1993).

- [10] 河村悟. :“視細胞における明順応の分子機構”. 科学, Vol. 63, No. 5, pp. 303-311, (1993).
- [11] 細川桂一. :“視覚と光信号変換と G 蛋白の役割”. *Neuro-ophthalmol*, Vol. 10, No. 2, pp. 178-187, (1993).
- [12] Baylor D.A. and Fuortes M.G. :“Electrical responses of single cones in the retina of the turtle”. *J. Physiol.*, Vol. 207, pp. 77-92, (1970).
- [13] Baylor D.A., Hodgkin A.L., and Lamb T.D. :“Reconstruction of the electrical responses of turtle cones to flashes and steps of light”. *J. Physiol.*, Vol. 242, pp. 759-791, (1974).
- [14] Torre V., Forti S., Menini A., and Campani M. :“Model of phototransduction in retinal rods”. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. LV, pp. 563-573, (1990).
- [15] Baylor D.A., Hodgkin A.L., and Lamb T.D. :“The electrical response of turtle cones to flashes and steps of light”. , *J. Physiol.*, Vol. 242, pp. 685-727, (1974).
- [16] Baylor D.A. and Hodgkin A.L. :“Change in time scale and sensitivity in turtle photoreceptors”. , *J. Physiol.*, Vol. 242, pp. 729-758, (1974).
- [17] Capovilla M., Cervetto L., and Torre V. :“Effects of changing external potassium and chloride concentrations on the photoresponses of bufo rod”. , *J. Physiol.*, Vol. 307, pp. 529-551, (1980).
- [18] Ichikawa K. :“A model for open-close control of cation channels in the plasma membrane of retinal rod outer segment”. *Neuroscience Research*, Vol. 6, pp. 377-396, (1989).
- [19] Barnes S. and Hille B. :“Ionic channels of the inner segment of tiger salamander cone photoreceptors”. *J. Gen. Physiol.*, Vol. 94, pp. 719-743, (1989).
- [20] Schnapf J.L., Nunn B.J., Meister M., and Baylor D.A. :“Visual transduction in cones of the monkey macaca fascicularis”. *J. Physiol.*, Vol. 427, pp. 681-713, (1990).

- [21] Bauer J. B. : "Cyclic GMP-gated channels of bovine rod photoreceptors affinity, density and stoichiometry of Ca^{2+} -calmodulin binding sites". *J. Physiol.*, Vol. 494, pp. 675-685, (1996).
- [22] Ichikawa K. : "Modeling and analysis of spatio-temporal change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a retinal rod outer segment". *Neurosci. Res.*, Vol. 25, pp. 137-144, (1996).
- [23] Torre V., Strforini M., and Campani M. : "An economic model of mechanisms underlying phototransduction". *International Symposium on Neural Information Processing as a Part of International Symposia on Information Sciences*, Vol. ISKIT 92, pp. 158-171, (1992).
- [24] Maricq A.V. and Korenbrot J.I. : "Calcium and calcium-dependent chloride currents generate action potentials in solitary cone photoreceptors". *Neuron*, Vol. 1, pp. 503-515, (1988).
- [25] Bader C.R., Bertrand D., and Schwartz E.A. : "Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina". *J. Physiol.*, Vol. 331, pp. 253-284, (1982).
- [26] Hodgkin A.L. and Huxley A.F. : "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve". *J. Physiol.*, Vol. 117, pp. 500-544, (1952).
- [27] 神山齊己, 石井宏幸, 臼井支朗. : "イオン電流モデルによる網膜 R/G 型水平細胞応答のダイナミックス解析". 信学論 (D-II), J74-D-II, 6, pp. 819-827, (1991-06).
- [28] Kaneko A. and Tachibana M. : "Effects of γ -aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina". *J. Physiol.*, Vol. 373, pp. 443-461, (1986).
- [29] Maricq A.V. and Korenbrot J.I. : "Potassium currents in the inner segment of single retinal cone photoreceptors". *J. Neurophysiology*, Vol. 64, pp. 1929-1940, (1990).
- [30] Maricq A.V. and Korenbrot J.I. : "Inward rectification in the inner segment of single retinal cone photoreceptors". *J. Neurophysiology*, Vol. 64, pp. 1917-1928, (1990).
- [31] Sala F. and Hernández C.A. : "Calcium diffusion modeling in a spherical neuron relevance of buffering properties". *Biophys. J.*, Vol. 57, pp. 313-324, (1990).

- [32] Simon S.M. and Llinás R. :“Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release”. *Biophys. J.*, Vol. 48, pp. 485-498, (1985).
- [33] Koch C. and Segen I., editors. :“*Methods in Neuronal Modeling*”. The MIT Press, (1989).
- [34] 久場健司. :“細胞内 Ca^{2+} の局在と膜電流 -不整脈研究の進歩”. 犬山不整脈カンファレンス, Vol. 1, pp. 68-95, (1992).
- [35] 阿部輝雄. :“神経終末における細胞内 Ca^{2+} の制御”. 蛋白質 核酸 酵素, 臨時増刊 神経生化学, Vol. 29, pp. 1212-1222, (1984).
- [36] Hestrin Shaul. :“The properties and function of inward rectification in rod photoreceptors of the tiger salamander”. *J. Physiol.*, Vol. 390, pp. 319-333, (1987).
- [37] Menini Anna. :“Currents carried by monovalent cations through cyclic GMP- activated channels in excised patches from salamander rods”. *J. Physiol.*, Vol. 424, pp. 167-185, (1990).
- [38] Baylor D.A., Matthews G., and Nunn B.J. :“Location and function of voltage-sensitive conductances in retinal rods of the salamander, *ambystoma tigrinum*”. *J. Physiol.*, Vol. 354, pp. 203-223, (1984).
- [39] Normann R.A. and Pochobradský J. :“Oscillations in rod and horizontal cell membrane potential: evidence for feed-back to rod in the vertebrate retina”. *J. Physiol.*, Vol. 261, pp. 15-29, (1976).
- [40] Fain G.L., Gerschenfeld H.M., and Quandt F.N. :“Calcium spikes in toad rods”. *J. Physiol.*, Vol. 303, pp. 495-513, (1980).
- [41] Yamada M. and Tauchi M. :“Oscillatory photoresponses of rods in the light-adapted Bullfrog retina”. *Biomedical Research*, Vol. 3, pp. 143-147, (1982).
- [42] Torre V., Ashmore J. F., Lamb T. D., and Menini A. :“Transduction and adaptation in sensory receptor cells”. *J. Neurosci.*, Vol. 15(12), pp. 7757-7768, (1995).

- [43] Neher E. and Augustine G. J. : "Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells". *J. Physiol.*, Vol. 450, pp. 273-301, (1992).
- [44] Tachibana M., Okada T., Arimura T., Kobayashi K., and Piccolino M. : "Dihydropyridine-sensitive calcium current mediates neurotransmitter release from bipolar cells of the goldfish retina". *J. Neuroscience*, Vol. 13, pp. 2898-2909, (1993).
- [45] Lagnado. L., Cervetto. L., and McNaughton P.A. : "Ion transport by the Na-Ca exchange in isolated rod outer segments". *Neurobiology*, Vol. 85, pp. 4548-4552, June (1988).
- [46] Huser J., Lipsius S. L., and Blatter L. A. : "Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes". *J. Physiol.*, Vol. 494.3, pp. 641-651, (1996).
- [47] Miyazaki S. : "IP₃ receptor-mediated spatial and temporal Ca²⁺ signaling of the cell". *J. J. of Physiology*, Vol. 43, pp. 409-434, (1993).
- [48] Nakatani K. and Yau K-W. : "Calcium and light adaptation in retinal rods and cones". *Nature*, Vol. 334, pp. 69-71, (1988).
- [49] Kawamura S. : "Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclicGMP phosphodiesterase regulation by S-modulin". *Nature*, Vol. 362, pp. 855-857, (1993).
- [50] 小椋俊彦, 神山齊己, 臼井支朗. : "網膜視細胞のイオン電流モデルと光応答のシミュレーション解析". 信学論 (D-II), Vol. J78(No.10), pp. 1512-1521, 1995.
- [51] 立花政夫. : "成熟脊椎動物からの網膜神経細胞の単離と培養". 生体の科学, Vol. 34, pp. 405-411, (1983).
- [52] 林秀晴, 金子雅則, 寺田肇. : "単一細胞における細胞内 Ca イオン濃度測定の実際". 日本生理学会誌, Vol. 57, pp. 441-450, (1995).
- [53] 高橋正紀, 津本忠治. : "網膜切片標本におけるカルシウムイメージング". 生体の科学, Vol. 57, pp. 25-38, (1990).

- [54] Yau K-W. and Nakatani K. :“Light-suppressible, cyclicGMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment”. *Nature*, Vol. 317, pp. 252-255, (1985).
- [55] Yau K-W. :“Phototransduction mechanism in retinal rods and cones”. *IOVS*, Vol. 35, pp. 9-32, (1994).
- [56] Hodgkin A.L. and Huxley A.F. :“Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*”. *J. Physiol.*, Vol. 116, pp. 424-448, (1952).
- [57] Hodgkin A.L. and Huxley A.F. :“Current carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*”. *J. Physiol.*, Vol. 116, pp. 449-472, (1952).
- [58] Hodgkin A.L. and Huxley A.F. :“The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.*, Vol. 116, pp. 473-496, (1952).
- [59] Hodgkin A.L. and Huxley A.F. :“The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*”. *J. Physiol.*, Vol. 116, pp. 497-506, (1952).
- [60] Torre V., Rispoli G., Menini A., and Cervetto L. :“Ionic selectivity, blockage and control of light-sensitivity channels”. *Neuroscience Research*, Vol. 6, pp. 25-44, (1987).
- [61] 石井宏幸, 神山齊己, 臼井支朗. :“イオン電流モデルを用いた神経細胞の入力電流推定法”. 信学論 (D-II), J75-D-II ,12, pp. 2056-2065, (1992).
- [62] 石原彰人. :細胞内カルシウム機構に基づく網膜視細胞シナプスのモデル化と視細胞・水平細胞間の伝達特性の解析. 特別実験報告書, March (1994).
- [63] Lagnado L. and Cervetto L. and Mcnaughton P.A. :“Calcium homeostasis in the outer segment of retinal rods from the tiger salamander”. *J. Physiol.*, Vol. 455, pp. 111-142, (1992).
- [64] Piccolino M. and Gerschenfeld H.M. :“Characteristics and ionic processes involved in feedback spikes of turtle cones”. *Proc. R. Soc. Lond. B* 206, pp. 439-463, (1980).
- [65] Martha C.N. and Martin J.P. :“Time courses of calcium and calcium-bound buffers following calcium influx in a model cell”. *Biophys. J*, Vol. 64, pp. 77-91, (1993).

- [66] Mead C. : "Analog VLSI and Neural Systems". Addison-Wesley Publishing Company, inc, (1989).
- [67] Mead C. (臼井 支朗, 米津 宏雄 訳): "アナログ VLSI と神経システム". トッパン, (1993).
- [68] Barnes S. and Deschenes M.C. : "Contribution of Ca and Ca-activated Cl channels to regenerative depolarization and membrane bistability". *J. Neurophysiology*, Vol. 68, pp. 745-755, (1992).
- [69] Sanford S.M. and Llinás L.R. : "Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release". *Biophys. J.*, Vol. 48, pp. 485-498, September (1985).
- [70] 吉井光信. : "神経細胞にみられる Ca^{2+} チャネルの異種性". 生体の化学, Vol. 38, No. 6, pp. 539-544, (1987).
- [71] Yamada W.M. and Zucker R.S. : "Time course of transmitter release calculated from simulations of a calcium diffusion model". *Biophys. J.*, Vol. 61, pp. 671-682, March (1992).
- [72] 河西春郎. : "脳の機能と Ca チャネル". 生体機能基礎研究の最前線, Vol. 33, No. 266, pp. 48-53, (1992).
- [73] Rowe J.S. : "Effects of external calcium on horizontal cell in the superfused goldfish retina". *Neuroscience Research*, pp. S147-S164, (1987).
- [74] 神山斉己. : "網膜外網状層神経回路の生理工学的研究". 博士論文, 豊橋技術科学大学, March (1991).
- [75] 池野英利. : "下等動物神経系における学習・記憶のメカニズムに関する生理工学的研究". 博士論文, 豊橋技術科学大学, June (1993).
- [76] 臼井支朗, 神山斉己. : "生物の視覚系". *OPTRONICS*, No. 2, pp. 47-52, (1993).
- [77] Akaike N., Kanaide H., and Kuga T. : "Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture". *J. Physiol.*, Vol. 416, pp. 141-160, (1989).

- [78] Martha C.N. and M.J. Pinter. :“Time courses of calcium and calcium-bound buffers following calcium influx in a model cell”. *Biophys. J.*, Vol. 64, pp. 77-91, January (1993).
- [79] Callaway J.C., Rossse N.L., Stuart A.E., and William N.R. :“Dynamics of intracellular free calcium concentration in the presynaptic arbors of individual barnacle photoreceptors”. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 13, No. 3, pp. 1157-1166, March (1993).
- [80] 宮本英七. :“脳における情報伝達系と蛋白質リン酸化反応”. *実験医学*, Vol. 11, No. 10, pp. 1364-1368, (1993).
- [81] Steinberg I.Z, Walton K., and Llinás R. :“Presynaptic calcium currents in squid giant synapse”. *Biophys. J.*, Vol. 33, pp. 289-322, March (1981).
- [82] Tachibana M. :“Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish”. *J. Physiol.*, Vol. 345, pp. 329-351, (1983).
- [83] 池野英利. :“膜イオン電流とギャップ特性に基づく 網膜水平細胞の時空間モデル”. 修士論文, 豊橋技術科学大学, March (1984).
- [84] 河合房夫. :“網膜水平細胞ネットワークの生理工学的研究”. 修士論文, 豊橋技術科学大学, March (1992).
- [85] McNaughton P.A. and Cervetto L. :The effects of phosphodiesterase inhibitors and lanthanum ions of the light-sensitive current of toad retinal rods. *J. Physiol.*, Vol. 370, p. 9, (1986).
- [86] Perry R.J. and McNaughton P.A. :“Response properties of cones from the retina of the tiger salamander”. *J. Physiol.*, Vol. 433, pp. 561-587, (1991).
- [87] Stephen J.S., George J.A., and M.P. Gharlton. :“Transmission at voltage-clamped giant synapse of the squid: Evidence for cooperativity of presynaptic calcium action”. *Proc. Acad. Sci. USA*, Vol. 82, pp. 622-625, January (1985).
- [88] Zucker R.S. and Fogelson A.L. :“Relationship between transmitter release and presynaptic calcium influx when calcium enters through discrete channels”. *Proc. Acad. Sci. USA*, Vol. 83, pp. 3032-3036, May (1986).

- [89] Parnas H., Hovav G., and Parnas I. : "Effect of Ca^{2+} diffusion on the time course of neurotransmitter release". *Biophys. J.*, Vol. 55, pp. 859-874, May (1989).
- [90] Bastian B.L. and Fain G.L. : "The effects of low calcium and background light on the sensitivity of toad rods". *J. Physiol.*, Vol. 330, pp. 307-329, (1982).
- [91] Eric M. Lasater and Paul Witkovsky. : "The calcium current of turtle cone photoreceptor axon terminals". *Neuroscience Research*, Vol. 15, pp. 165-173, (1991).
- [92] Kaneko A. and Shimazaki H. : "Synaptic transmission from photoreceptors bipolar and horizontal cells in the carp retina". *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. XL, pp. 537-546, (1976).
- [93] Levitan B. I. and Kaczmarek K. L., editors. : "*The neuron (cell and molecular biology)*". Oxford University Press, (1991).
- [94] Leibovic K.N., editor. : "*Science of Vision*". Springer-Verlag New York Inc, (1990).
- [95] Kaneko K. and Hashimoto H. : "Recording site of the single cone response determined by an electrode marking technique". *Vision Res*, Vol. 7, pp. 847-851, (1967).
- [96] Tomita T., Kaneko A., Murakami M., and Pauler E.L. : "Spectral response curves of single cones in the carp". *Vision Res*, Vol. 7, pp. 519-531, (1967).
- [97] Fain G.L. and Lisman J.E. : "Membrane conductances of photoreceptors". *Biophys. molec. Biol.*, Vol. 37, pp. 91-147, (1981).
- [98] Attwell D. and Wilson M. : "Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods". *J. Physiol.*, Vol. 309, pp. 287-315, (1980).
- [99] Nakatani K. and Yau K-W. : "Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment". *J Physiol*, Vol. 395, pp. 695-725, (1988).
- [100] 小椋俊彦, 神山齐己, 臼井支朗. : "視細胞内節のイオン電流モデル". 信学論 (D-II), Vol. J78(No.10), pp. 1501-1511, 1995.

- [101] DiFrancesco D. and Noble D. : "A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes". *Philosophical Transactions of The Royal Society*, Vol. 307, pp. 353-398, (1985).
- [102] 白川正輝, 白井支朗. : "Hodgkin-Huxley 型細胞ネットワークモデルのシミュレーションにおける自動刻み幅数値積分法の改良". 信学論 (D-II), Vol. J77-D-II, 10, pp. 2112-2120, (1994-10).
- [103] McNaughton P.A. : "The light response of vertebrate photoreceptors". *Physiological Reviews*, Vol. 70, pp. 847-883, (1990).
- [104] Yau K-W. and Baylor D.A. : "Cyclic GMP - activated conductance of retinal photoreceptor cells". *Ann Rev Neurosci*, Vol. 12, pp. 289-327, (1989).
- [105] Wollmuth L.P. and Hille B. : "Ionic selectivity of i_h channels of rod photoreceptors in tiger salamanders". *J. Gen. Physiol*, Vol. 100, p. 749, (1992).
- [106] Hodgkin A. L., McNaughton P. A., and Nunn B. J. : "The ionic selectivity and calcium dependence of the light-sensitive pathway in toad rods". *J. Physiol.*, Vol. 358, pp. 447-468, (1985).
- [107] Wellis D. P. and Werblin F. S. : "Dopamine modulates GABA_A receptors mediating inhibition of calcium entry into and transmitter release from bipolar cell terminals in tiger salamander retina". *J. Neuroscience*, Vol. 15, pp. 4748-4761, (1995).
- [108] Heidelberger R. and Matthews G. : "Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons". *J. Physiol.*, Vol. 447, pp. 235-256, (1992).
- [109] Koutalos Y., Nakatani K., and Yau K-W. : "Cyclic GMP diffusion coefficient in rod photoreceptor outer segments". *Biophys. J.*, Vol. 68, pp. 373-382, (1995).
- [110] Kasai H. : "Cytosolic Ca^{2+} gradients, Ca^{2+} binding proteins and synaptic plasticity". *Neurosci. Res.*, Vol. 16, pp. 1-7, (1993).
- [111] Hardie R. C. : "INDO-1 measurements of absolute resting and light -induced Ca^{2+} concentration in *Drosophila* photoreceptor". *J. Neurosci.*, Vol. 16(9), pp. 2924-2933, (1996).

[112] Rieke F. and Schwartz E. A. : "A cGMP-gated current can control exocytosis cone synapses". *Neuron*, Vol. 13, pp. 863-873, (1994).

学術論文

1. 小畑 俊彦, 神山 齊己, 白井 文昭, "網膜視細胞のイオン電流モデル", 電子情報通信学会論文誌, Vol. J79-Nb.10, pp. 1801-1811, (1996)
2. 小畑俊彦, 神山齊己, 白井文昭, "網膜視細胞のイオン電流モデルと光応答のシミュレーション解析", 電子情報通信学会論文誌, Vol. J79-Nb.10, pp. 1812-1821, (1996)

国際会議

1. Ochi, S., Ogura, T., Kamiyama, Y. "An analysis of the light response of photoreceptor with the ionic current model", The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Vol.33, No.4, pp. 2433, (1994).
2. Ochi, S., Ogura, T., Kamiyama, Y. "Rod bipolar cells receive direct input from rod horizontal cells via GABAergic pathway in the carp retina", The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Vol.34, No.4, pp. 1209, (1995).
3. Ochi, S., Kamiyama, Y., Ogura, T., Ishihara, K., "Reconstruction of the rod outer plexiform layer based on the ionic current mechanism", The Second Joint Meeting of the Physiological Society of Japan and U.K. and IIR, pp. 9, (1995).
4. Ochi, S., Kamiyama, Y., Ogura, T., Kodama, I., Toyama, J. "Effects of rotalenoic acid (RL-PS-49) on the ventricular action", Proceedings of the International Satellite Symposium of the 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Recent progress in electrophysiology of the heart, CRC press), pp. 47-48, (1996)

学会発表

1. 小畑 俊彦, 神山 齊己, 白井 文昭, "網膜視細胞のイオン電流モデルと光応答のシミュレーション解析", 第71回日本生体医学会大会, pp. 217 (1994).
2. 小畑 俊彦, 神山 齊己, 白井 文昭, "網膜視細胞のイオン電流モデル", 日本神経生理学会第5回全国大会, pp. 106 (1994).

研究業績一覧

学術論文

1. 小椋 俊彦, 神山 齊己, 臼井 支朗: “視細胞内節のイオン電流モデル”, 電子情報通信学会 D-II 論文誌, Vol. J78-No.10, pp. 1501-1511, (1995).
2. 小椋俊彦, 神山齊己, 臼井支朗: “網膜視細胞のイオン電流モデルと光応答のシミュレーション解析”, 電子情報通信学会 D-II 論文誌, Vol. J78-No.10, pp. 1512-1521, (1995).

国際会議

1. Usui, S., Ogura, T., Kamiyama, Y. : “An analysis of the light responses of photoreceptor with the ionic current model”, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Vol.35, No.4, pp. 2123, (1994).
2. Usui, S., Ogura, T., Kamiyama, Y. : “Rod bipolar cells receive direct input from rod horizontal cells via GABA-ergic pathway in the carp retina”, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Vol.36, No.4, pp. 1309, (1995).
3. Usui, S., Kamiyama, Y., Ogura, T., Ishihara. A., : “Reconstruction of the retinal outer plexiform layer based on the ionic current mechanisms”, The Second Joint Meeting of the Physiological Societies of Japan and U.K. and Eire, pp. 9, (1995).
4. Usui, S., Kamiyama, Y., Ogura, T., Kodama, I., Toyama, J. : “Effects of zatebradine (UL-FS 49) on the vertebrate retina”, Proceedings of the International Satellite Symposium of the 59 th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Recent progress in electropharmacology of the heart, CRC press), pp. 37-46, (1996).

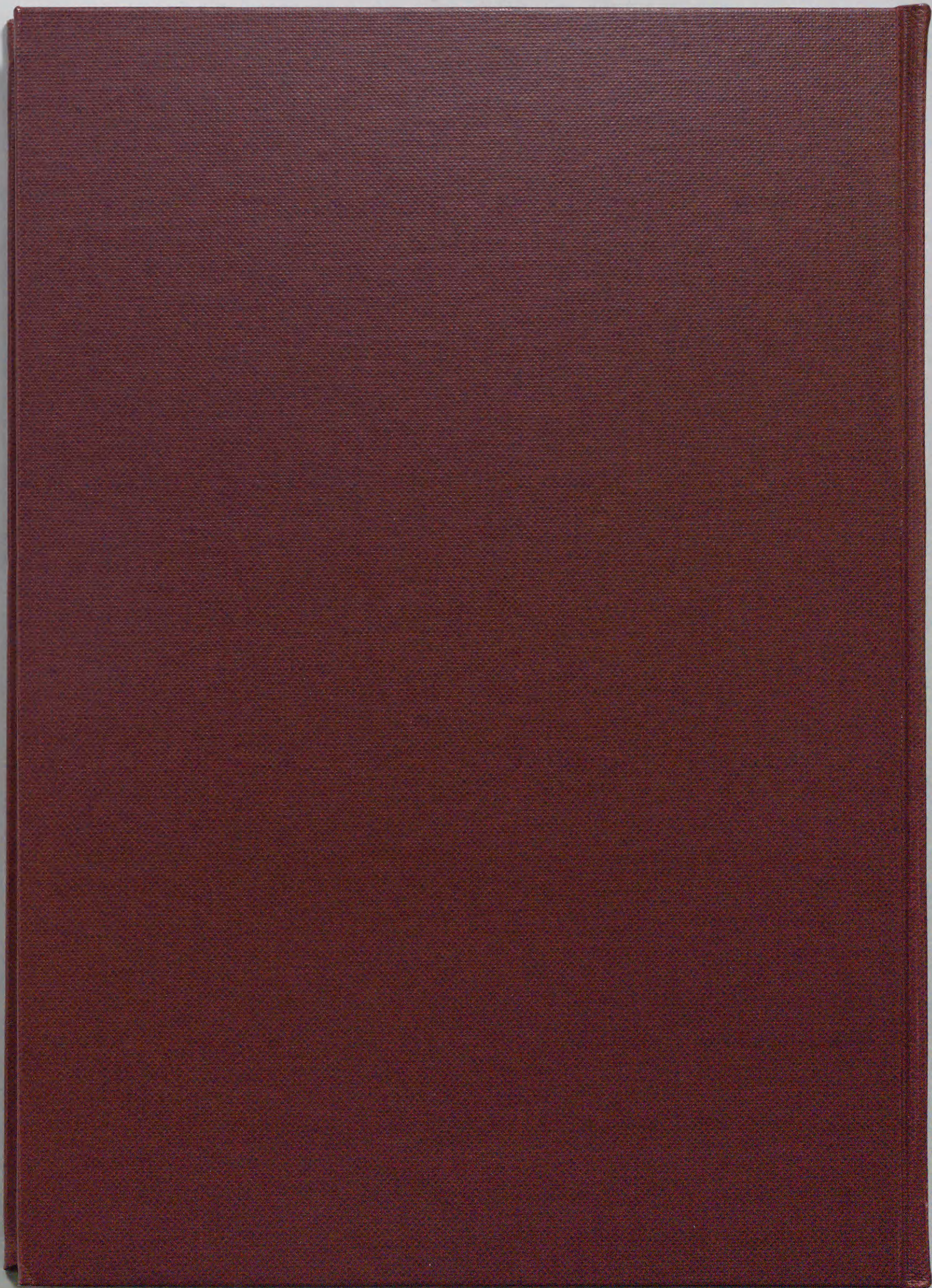
学会発表

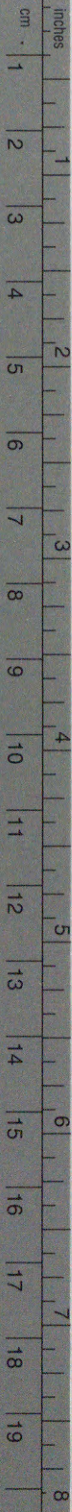
1. 小椋 俊彦, 神山 齊己, 臼井 支朗: “網膜視細胞のイオン電流モデルと光応答のシミュレーション解析”, 第 71 回日本生理学会大会, pp. 217 (1994).
2. 小椋 俊彦, 神山 齊己, 臼井 支朗: “網膜視細胞のイオン電流モデル”, 日本神経回路学会第 5 回全国大会, pp. 106 (1994).

3. 小椋 俊彦, 神山 斉己, 臼井 支朗: “杆体水平細胞と双極細胞の入出力特性の解析”, 第72回日本生理学会大会, pp. 50 (1995).

シンポジウム、研究会

1. 河合 房夫, 小椋俊彦, 石井 宏幸, 神山斉己, 臼井支朗: “灌流実験と入力電流実験法による網膜L型水平細胞応答ダイナミクスの解析”, 第7回生体・生理工学シンポジウム, pp. 11-16, (1992).
2. 小椋 俊彦, 神山 斉己, 臼井 支朗: “網膜視細胞のイオン電流モデル”, 平成5生理研視覚研究会, (1993).
3. 小椋 俊彦, 神山 斉己, 臼井 支朗: “視細胞内節のイオン電流モデル”, 電子情報通信学会技術報告, NC93-55~67. pp. 17-24, (1993).
4. 小椋 俊彦, 石原 彰人, 石井宏幸, 神山 斉己, 臼井 支朗: “イオン電流モデルによる杆体双極細胞と杆体水平細胞の光応答”, 平成7生理研視覚研究会, (1995)
5. 小椋 俊彦, 神山 斉己, 臼井 支朗: “網膜視細胞の細胞内カルシウム機構の時空間特性の解析”, 電子情報通信学会技術報告, NC96-430. pp. 127-134, (1996).





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

