

博士論文

論文題目

網膜の ON 型運動方向選択性細胞に関する研究

氏名

雁木 美衣

目次

第 1 章 序論	5
網膜の基本構造	5
ON 経路と OFF 経路	6
緩電位応答とスパイク応答	8
神経節細胞からの光応答の記録 (黎明期)	9
網膜における運動方向選択性神経節細胞の研究	10
第 2 章 ラットにおける ON 型運動方向選択性細胞の応答特性	16
1. 目的	16
2. 方法	16
2-1 動物	16
2-2 トレーサーの注入	17
2-3 網膜標本	17
2-4 電気生理	18
2-5 光刺激	20
2-6 形態観察	21
2-7 解析	22
3. 結果	23
3-1 MTN に投射する網膜神経節細胞の形態	23
3-2 運動方向選択性の維持に必要な光刺激領域	23
3-3 DSGC の速度依存性	25

3-4 矩形波縞に対する応答	26
4. 考察.....	27
4-1 ウサギ網膜 DSGC との相違点.....	27
4-2 ON 型、ON-OFF 型 DSGC の最適刺激	29
第 3 章 逆行性越シナプストレーサーを用いたアマクリン細胞の検討	31
1. 目的.....	31
2. 方法.....	32
2-1 動物	32
2-2 ウイルス	32
2-3 ウイルスの脳への注入	33
2-4 灌流固定	34
2-5 薄切.....	34
2-6 脳の染色.....	35
2-7 網膜の染色	37
3. 結果.....	38
3-1 狂犬病ウイルスの注入部位	38
3-2 網膜における狂犬病ウイルス陽性ニューロン.....	38
3-3 多重染色による 2 次感染ニューロンの同定	39
3-4 SAC は狂犬病ウイルスに感染するのか?	40
3-5 まとめ.....	40
4. 考察.....	41
4-1 狂犬病ウイルスの感染	41
4-2 ON 型 DSGC に入力する細胞.....	42
4-3 ON 型 DSGC に入力する GABA 作動性アマクリン細胞	43

第 4 章 異所性アマクリン細胞の性質	44
1. 目的.....	44
2. 方法.....	44
3. 結果.....	45
3-1 Medium-field displaced amacrine cells.....	46
3-2 Wide-field displaced amacrine cells.....	47
3-2-1 Polyaxonal amacrine cells	48
3-3 スパイク波形の比較	49
4. 考察.....	50
4-1 スパイク発火するものは軸索をもつのか	50
4-2 内網状層内での軸索の位置	51
4-3 スパイク波形と機能	51
4-4 アマクリン細胞のさらなる分類	52
第 5 章 運動方向選択性の形成に関わるアマクリン細胞	54
1. 目的.....	54
2. 方法.....	54
3. 結果.....	55
3-1 ON 型 DSGC への入力	55
3-2 TTX の効果	57
4. 考察.....	58
4-1 興奮性入力に対する TTX の効果	59
4-2 抑制性入力に対する TTX の効果	59
第 6 章 総合考察.....	62

ON 型 DSGC に入力するアマクリン細胞の候補	63
運動方向選択性のメカニズム	64
実験結果から考えられるモデル	66
副視索系について	66
上丘との比較	68
ON型DSGCの役割	68
今後の展望	69
謝辞	71
引用文献	72

第1章 序論

外界の像は、角膜や瞳孔、レンズを通して網膜上に焦点を結ぶが、その網膜像は上下左右が逆転し、わずかに歪みすらもっている。我々はその不完全な像から 3 次元世界を脳によって再構築し、共通の色や形や運動や奥行きを感じて生活している。そのためには、様々な符号化と復号化のルールが存在し、仮説が存在し、経験から得た知識も必要とされる。神経節細胞は外界の像を活動電位（スパイク）列により符号化するが、それぞれのニューロンは単にその視野上の担当領域の明るさを画素情報として脳に送っているわけではない。網膜内の神経回路網により多様な特徴抽出が行われ、それらの結果が並列的に出力されている。しかしながら、抽出される情報の内容やそれを実現する神経基盤については不明な点が多い。本研究では、運動方向を伝えるニューロンに着目し、特徴を抽出するメカニズムを探索した。

網膜の基本構造

全ての脊椎動物の網膜は、2つのシナプス層（外網状層、内網状層）が3つの細胞層（外顆粒層、内顆粒層、神経節細胞層）に挟まれた基本構造をしている（図 1.1）（Polyak, 1941）。眼球から入った光は、水晶体、硝子体を通して網膜に到り、網膜層の最奥に位置する視細胞（図 1.1a）の外節に吸収される。網膜のニューロンには他に、水平細胞（図 1.1b）、双極細胞（図 1.1c）、アマクリン細胞（図 1.1d）、神経節細胞（図 1.1e）という主要な 4 種類のニューロンが存在する。視細胞の細胞体は外顆粒層に存在し、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞の 3 種類の細胞体は内顆粒層に存在する。水平細胞は内顆粒層の最も外網状層側に位置し、双極細胞は中間部に多く存在し、アマクリン細胞は内顆粒層の内網状層との境界付近に配列している。そして、神経節細胞の細胞体は神経節細胞層に存在する。網膜ニューロンの細胞体の配置についてはしばしば例外が生じ、水平細胞や双極細胞が外顆粒層に位置していたり、神経節細胞が内顆粒層や内網状層に位置したり、アマクリン細胞が神経節細胞層に位置したりする。このようなニューロンは「異所性」細胞と呼ばれるが、神経

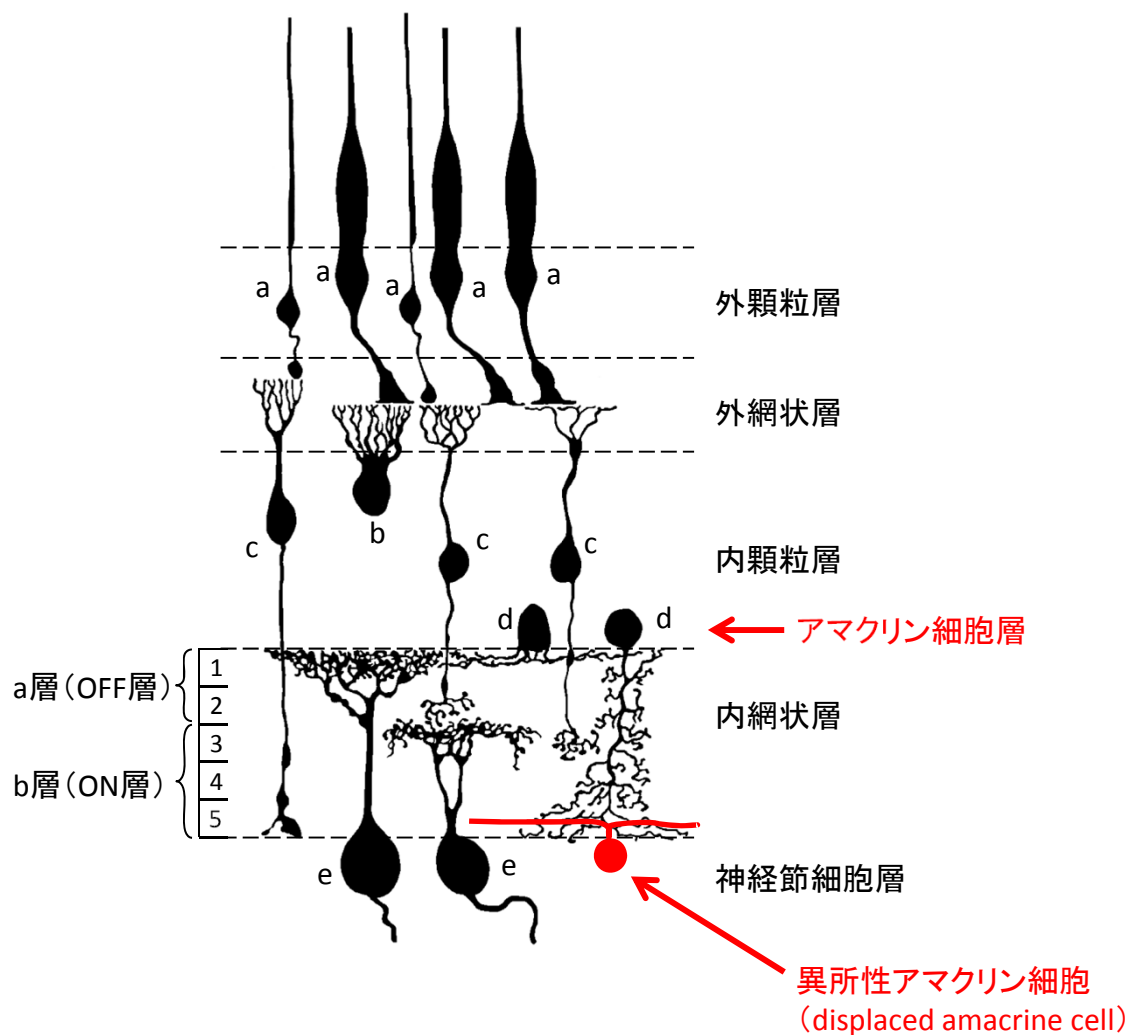


図1.1 網膜の模式図

a: 視細胞、b: 水平細胞、c: 双極細胞、d: アマクリン細胞、e: 神経節細胞。視細胞の細胞体が存在する層を外顆粒層、視細胞、双極細胞、水平細胞がシナプス結合している層を外網状層、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞の細胞体が存在する層を内顆粒層、双極細胞、神経節細胞、アマクリン細胞がシナプス結合している層を内網状層、神経節細胞が存在する層を神経節細胞層という。内網状層は、OFF信号の伝達が行われるa層と、ON信号の伝達が行われるb層に分かれる。内顆粒層のほとんど内網状層よりの部分にはアマクリン細胞が多数存在することから、アマクリン細胞層という。通常的位置(アマクリン細胞層)ではなく、神経節細胞層に存在するアマクリン細胞を異所性アマクリン細胞と呼ぶ。(Polyak, 1941より改変)

節細胞層に異所性アマクリン細胞が存在することは、全ての脊椎動物の網膜に共通の特徴である (Dowling, 2012)。

光は視細胞で電気信号に変換され、外網状層におけるシナプス伝達により双極細胞に信号が受け渡される。また外網状層では、水平細胞が側方に広くプロセスを伸ばし、このシナプス層内における情報修飾を行っている。双極細胞の信号は、内網状層におけるシナプス伝達により、網膜の出力細胞である神経節細胞に受け渡される。内網状層における情報修飾はアマクリン細胞が担っており、双極細胞も神経節細胞も様々な影響を受ける。神経節細胞の軸索は網膜の硝子体側を走行して視神経乳頭に集まり、視神経を形成し、眼球から脳へ視覚情報を送る。

ON 経路と OFF 経路

視細胞には暗所視を司る桿体細胞と、明所視を司る錐体細胞があるが、いずれも光の照射に対して過分極応答を示す (Tomita *et al.*, 1967; Fain & Dowling, 1973)。過分極とは、普段細胞外に対して細胞内が電氣的に分極している (負の値に保持されている) 状態からさらに、電位が下がるということである。膜電位が上昇しなければ、電位依存性のカルシウムチャネルが開かず、伝達物質であるグルタミン酸を放出することができない。したがって、視細胞は光が照射されたときにはグルタミン酸の放出量を減らし、暗闇でグルタミン酸を放出している。視細胞からシナプス入力を受ける双極細胞は、ON 型か OFF 型かによって反対の応答を示す。ON 型は視細胞とは信号が逆転し、光の照射に対して脱分極 (分極状態から脱するという意味、つまり電位が 0 mV に向かって上昇する) 応答を示す。OFF 型は視細胞と同じく、光の照射に対して過分極する (Werblin & Dowling, 1969; Kaneko, 1970; Matsumoto & Naka, 1972; Schwartz, 1974)。この違いは、発現しているグルタミン酸受容体の種類が異なるために生じる。ON 型には代謝型グルタミン酸受容体の一つである mGluR6 が発現し (Nakajima *et al.*, 1993)、OFF 型にはイオンチャネル型グルタミン酸受容体が発現している (Slaughter & Miller, 1983; DeVries & Schwartz, 1999)。代謝型受容体とは、Gタンパク質共役型受容体であり、受容体にリガンドが結合するとGタンパク質が活性化される受容

体である。活性化された G タンパク質が、直接イオンチャネルの開閉をコントロールする場合もあれば、セカンドメッセンジャーと呼ばれる細胞内情報伝達物質を介して、細胞に様々な機能発現をもたらすこともある。mGluR6 の場合は、グルタミン酸が受容体に結合すると、Go という種類の G タンパク質が活性化され、それが陽イオンチャネルを閉じることで ON 型双極細胞が過分極する。最近になって、その G タンパク質が作用する陽イオンチャネルが Transient Receptor Potential (TRP) チャネルの内、TRPM1 と呼ばれるものであることが判明した (Koike *et al.*, 2010)。一方、イオンチャネル型グルタミン酸受容体は、グルタミン酸が受容体に結合すると、陽イオンチャネルが開き、その結果、細胞に脱分極を引き起こす。したがって、暗闇でグルタミン酸が放出されているとき、代謝型グルタミン酸受容体を発現している ON 型双極細胞は過分極し、イオンチャネル型グルタミン酸受容体を発現している OFF 型は脱分極する。逆に光の照射に対しては、ON 型は脱分極し、OFF 型は過分極する。

このように、双極細胞の段階で ON 経路と OFF 経路が分かれるが、内網状層においても、ON 経路、OFF 経路が解剖学的に整然と分かれている (Famiglietti & Kolb, 1976; Famiglietti *et al.*, 1977; Nelson *et al.*, 1978)。ON 型の双極細胞は内網状層の b 層へ、OFF 型の双極細胞は内網状層の a 層へ軸索を伸ばしている。神経節細胞も、スポット光を照射した時に応答する ON 型は b 層に樹状突起を伸ばし、スポット光を消したときに応答する OFF 型は a 層へ樹状突起を伸ばして情報を受け取っている (Famiglietti *et al.*, 1977; Nelson *et al.*, 1978)。アマクリン細胞も同様である。またスポット光を照射した時と、消した時に応答する ON-OFF 型神経節細胞やアマクリン細胞は、a 層と b 層の両方に樹状突起を伸ばしている (Famiglietti *et al.*, 1977)。Ramón y Cajal (1972) は、内網状層に双極細胞の軸索終末と神経節細胞の樹状突起で構成される神経叢が 5 層存在すると報告している。3 層は内網状層の中に存在し、残りの 2 層は内網状層の内顆粒層との境界および神経節細胞層との境界に存在している。哺乳類では Cajal の 1, 2 層が a 層、3-5 層が b 層に相当する (Famiglietti & Kolb, 1976)。

緩電位応答とスパイク応答

無脊椎動物や脊椎動物の中樞神経系では、スパイク発火によって情報を伝えている。ところが、脊椎動物の網膜では、典型的なスパイク発火は神経節細胞とアマクリン細胞にしか見られず、視細胞、水平細胞、双極細胞は光刺激に対して基本的には緩電位(時間経過が遅く、刺激強度に応じて振幅が増減する電位変化)応答を示す。スパイク発火のような全か無かのイベントでは、閾値下の信号を切り捨ててしまうが、緩電位応答であれば、情報を失うことなく、次の細胞へ伝えることができる。また、これらの細胞は短いプロセスしか持っておらず、双極細胞でも長さが 100~150 μm しかないので、緩電位であっても十分に樹状突起から軸索まで情報を伝えることができるといわれている(Dowling, 2012)。

ただし、視細胞、水平細胞、双極細胞においても、電位依存性のチャネルは発現しており(Tachibana, 1981; Bader *et al.*, 1982; Tachibana, 1983; Kaneko & Tachibana, 1985)、ただ受動的に電位を伝えているわけではない。さらに、神経節細胞のスパイク発火とは異なるが、全か無かの法則に従うスパイクが発生することも報告されている。単離された硬骨魚類の水平細胞ではカルシウムスパイク(Tachibana, 1981)や、ナトリウム+カルシウムスパイク(Shingai & Christensen, 1983)の存在が報告され、単離された双極細胞(Burrone & Lagnado, 1997; Zenisek & Matthews, 1998)やスライス標本における双極細胞(Protti *et al.*, 2000; Arai *et al.*, 2010)でもカルシウムスパイクが報告されている。しかし、いずれも神経節細胞のスパイク発火とは異なり、持続時間が長かったり、比較的ゆっくりとした時間経過をたどる。哺乳類では、ラットの単離した双極細胞とスライス標本における双極細胞においてナトリウムスパイクが報告されている(Pan & Hu, 2000; Ma *et al.*, 2005)。このナトリウムスパイクは速い時間経過をたどるが、同時にこの双極細胞は T 型、L 型のカルシウムチャネルも発現しているため(Pan, 2000)、持続的な脱分極に短いナトリウムスパイクが重畳する形になる。しかも脱分極性の電流注入に対して、1 発しかスパイクを発生させない。したがって伝達物質の放出にどの程度の寄与があるのかは不明である。また、光応答時にスパイクを発生させるのかどうかも不明である。

これに対し、アマクリン細胞と神経節細胞は光応答時にスパイクを発生させることが知られている。ただ、アマクリン細胞の中には、緩電位応答しか示さないものも存在する。また光刺激に対してスパイクを発生させても、1 発か、数発という細胞も数多く存在する(Werblin & Dowling, 1969; Naka & Otsuka, 1975)(第 4 章参照)。

神経節細胞からの光応答の記録 (黎明期)

カエル網膜で、単一の視神経から光応答を初めて記録したのは、Hartline である(Hartline, 1938)。彼は視神経を 3 種類に分類した。光が現れた時、始めに高頻度で発火し、その後一定の発火頻度で光がついている間応答を持続させ、光が消えると応答が消失するタイプ、光の出現、消失両方に短く高頻度で発火するタイプ、光がついている時は応答せず、光が消えると持続的に発火するタイプである。これらのサブタイプは ON 型、ON-OFF 型、OFF 型と呼ばれ、今なお初期視覚系のニューロンの基本的な分類法となっている。また彼は「受容野」の概念を視覚系に初めて適用した人でもある。Hartline の「受容野」とは、その場所に光を照射することによって、視神経の発火を引き起こすことができる網膜内の領域である。Kuffler はその「受容野」の概念を、神経節細胞と機能的につながっている領域にまで拡大した(Kuffler, 1953)。つまり直接その場所の刺激が神経節細胞に発火を引き起こすことができなくても、神経節細胞の発火に抑制性や興奮性の影響を与える領域をも含めて受容野としたのである。そして、ネコの神経節細胞における共通の特徴として中心-周辺拮抗型受容野を見出した。中心-周辺拮抗型受容野とは、中心領域と周辺領域は逆の特性をしており(例えば、中心が ON なら周辺は OFF)、お互いの領域が相互に抑制し合っている受容野である。また Kuffler の大きな功績は、生きた動物を使って実験する *in vivo* 実験の手法を確立したことである。このことによって、レンズや硝子体などの眼球のシステムはそのままで実験できるようになった。Barlow は、カエルの神経節細胞の受容野特性をスポットサイズを変えて詳細に検討し、空間加重や周辺抑制の様式がサブタイプによって異なることを示した(Barlow, 1953)。さらに、Lettvin は、Hartline の分類法にとらわれず、時空間的に多様な刺激を呈示して、それらに対する応答特性か

らカエルの視神経が抽出している特徴を同定することを試み、神経節細胞を 4 種類に分類した (Lettvin *et al.*, 1959)。4 種類とは、Sustained Contrast Detectors (Hartline の ON 型に相当)、Net Convexity Detectors、Moving-Edge Detectors (Hartline の ON-OFF 型に相当)、Net Dimming Detectors (Hartline の OFF 型に相当) である。Net Convexity Detectors とは、小さな暗いオブジェクトに対してよく応答する種類で、まっすぐなエッジには応答せず、エッジが凸型になればなる程応答が大きくなるというものである。また Wagner らはキンギョ網膜において、光の波長によって応答特性 (ON 応答か OFF 応答か) が変化する神経節細胞を見出し、さらに詳しく受容野の空間プロファイルを検討したところ、色対立型の中心-周辺拮抗型受容野になっていることを発見した (Wagner *et al.*, 1960a; Wagner *et al.*, 1960b)。サルにおいても、波長によって応答特性が変化する神経節細胞がこの頃見つかった (Hubel & Wiesel, 1960)。このように神経節細胞の受容野特性が次々と明らかになる中、Barlow と Hill はウサギの網膜において、運動方向選択性神経節細胞 (DSGC: Direction selective ganglion cell) を発見した (Barlow & Hill, 1963)。

網膜における運動方向選択性神経節細胞の研究

運動方向選択性とは、ある方向に運動する刺激に対してはよく応答するが、逆の方向に運動する刺激に対してはほとんど応答しない性質を指す。運動方向選択性をもつ細胞がよく応答する運動方向を選好方向 (preferred direction)、その逆の方向を非選好方向 (null direction) という。運動方向選択性を持つ細胞はまずネコの皮質において発見されたが (Hubel, 1959; Hubel & Wiesel, 1959; Hubel & Wiesel, 1962)、さらに初期の段階である網膜においてすでに運動方向選択性をもつ細胞が存在することが 1963 年に Barlow & Hill によって報告された (Barlow & Hill, 1963)。また、その直後にハトの網膜でも同じ性質をもつ神経節細胞があることが報告されている (Maturana & Frenk, 1963)。

～1980年代

それ以来、網膜における DSGC の研究は半世紀にも及び、数多くの知見が積み重ねられている。研究初期には、まず DSGC 自体の刺激に対する応答特性や、薬理学的な性質が調べられた。ウサギ網膜における DSGC は Barlow らによって 2 種類報告された。光刺激のオン時とオフ時に応答する ON-OFF 型 DSGC と、光刺激のオン時のみに応答する ON 型 DSGC である (Barlow *et al.*, 1964; Barlow & Levick, 1965)。ON-OFF 型は 10° /秒以上の速い刺激によく応答するのに対して、ON 型 DSGC は 1° /秒以下の非常に遅い刺激に対してよく応答する (Oyster *et al.*, 1972)。また、ON-OFF 型 DSGC には、上方向の動きによく応答するタイプ、下方向の動きによく応答するタイプ、前方向 (耳側から鼻側) の動きによく応答するタイプ、後ろ方向 (鼻側から耳側) の動きによく応答するタイプという 4 つのサブタイプがあるのに対して、ON 型 DSGC は上、下、前方向に選択的に応答する 3 つのサブタイプが存在する (Oyster & Barlow, 1967; Oyster, 1968)。

DSGC がどのような刺激に対して運動方向選択的に応答するのかについても詳しく調べられた。受容野内で、刺激領域をスリット状に制限し、そこに白黒のエッジを動かしたり、2 本のスリット光を連続して呈示することで、運動方向選択性が観察される最少の運動距離が求められた (Barlow & Levick, 1965; Wyatt & Daw, 1975)。ON 型 DSGC についてはほとんどデータがないが、ON-OFF 型 DSGC では、 $1/4^\circ$ 前後の運動距離があれば、運動方向選択性が保たれた。薬理学的実験からは、ON-OFF 型 DSGC、ON 型 DSGC とも GABA 受容体の阻害剤である Picrotoxin によって運動方向選択性が消失することが報告された (Caldwell *et al.*, 1978; Ariel & Daw, 1982)。Picrotoxin を投与すると、非選好方向でのスパイク発火が増加し、選好方向でのスパイク発火と差がなくなってしまう。このことから、抑制性の伝達物質である GABA によって非選好方向の応答が抑制されていたことが明らかになった。また興奮性の伝達物質であるアセチルコリンは、DSGC に作用することが知られていたが (Masland & Ames, 1976)、アセチルコリン受容体の阻害剤を投与しても運動方向選択性は維持された (Ariel & Daw, 1982)。

1984 年になって初めて ON-OFF 型 DSGC の形態が明らかになった (Amthor *et al.*, 1984)。

ON-OFF 型 DSGC は内網状層の a 層 (OFF 層) と b 層 (ON 層) の両方に樹状突起を伸ばす特徴的な形態をしていた。また、アセチルコリンを放出するアマクリン細胞 (Masland & Mills, 1979) が starburst amacrine cell (SAC) であることが明らかになり (Famiglietti, 1983)、その詳しい形態も明らかになってきた (Masland *et al.*, 1984; Tauchi & Masland, 1984)。SAC は、細胞体を内顆粒層にもち、内網状層の a 層 (OFF 層) に樹状突起を伸ばす a 型と、細胞体を神経節細胞層にもち、b 層 (ON 層) に樹状突起を伸ばす b 型 (異所性アマクリン細胞) が存在している。内網状層におけるそれぞれの SAC の樹状突起の位置は ON-OFF 型 DSGC の樹状突起の位置と非常に類似していた。すでに薬理学的実験により、アセチルコリンの運動方向選択性形成への関与は否定されていたが、SAC が GABA も放出することが明らかになり (O'Malley & Masland, 1989; O'Malley *et al.*, 1992)、SAC が ON-OFF 型 DSGC へ抑制性の入力を送る最有力候補となった。

1990年代～

ところが、1997 年、ON-OFF 型 DSGC の周囲にある b 型の SAC をレーザーにより死滅させても、ON-OFF 型 DSGC の運動方向選択性が維持されるという報告がなされ (He & Masland, 1997)、運動方向選択性に関与するアマクリン細胞の候補が消えてしまった。このころから、分子生物学の発展により遺伝子改変動物が作製されるようになり、神経回路の解析を目的とする実験にも使用されるようになった。SAC を遺伝子的に標識した (GFP-human interleukin-2 receptor α -subunit (hIL-2R α) を発現させた) マウスを用い、SAC に特異的に結合する毒素 (hIL-2R α に対する抗体にバクテリア毒素を結合させたもの) を眼球内に注入し、選択的に SAC を死滅させたところ、ON-OFF 型神経節細胞の運動方向選択性が消失した (Yoshida *et al.*, 2001)。そして翌年、b 型 SAC と ON-OFF 型 DSGC を同時記録した実験において、非選好側 (null side、非選好方向へ運動する刺激が発する側) の SAC を刺激したときのみ、ON-OFF 型 DSGC に抑制性の入力があることが報告された (Fried *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010)。この実験結果により、SAC は、非選好側でのみ ON-OFF 型 DSGC とシナプス結合していることが示唆され、この非対称なシナプス結合が

運動方向選択性を形成しているメカニズムであるとの提案がなされた。また、SAC のカルシウムイメージングを行った実験では、SAC の放射状に伸びる樹状突起は個別に機能しており、細胞体のある中心から樹状突起の先端方向へ動く光刺激によく応答することが報告された(Euler *et al.*, 2002; Hausselt *et al.*, 2007)。さらに電子顕微鏡を用いた詳細な形態学的研究では、SACはその樹状突起の方向と null direction が一致する ON-OFF 型 DSGC と選択的にシナプス結合していることが示された(Briggman *et al.*, 2011)。つまり、SAC は、樹状突起の方向によって、選好方向が異なる複数の ON-OFF 型 DSGC と結合しており、それぞれに効果的に抑制をかけることで、各 ON-OFF 型 DSGC の非選好方向を形成していることが明らかになった。

ON型DSGCの研究

一方、ON 型 DSGC についての研究は ON-OFF 型と比較して数が少なく、あまり進まなかった。DSGC の発見当初こそ、ON-OFF 型との刺激速度依存性の違いや、サブタイプの種類の違いが報告されたが、それ以降はあまり注目されなかった。副視索系の神経核の一つである MTN (medial terminal nucleus) に逆行性のトレーサーを注入すると、共通の特徴を持った神経節細胞の 1 集団がラベルされることが知られており(Buhl & Peichl, 1986; Dann & Buhl, 1987)、MTN ニューロンの応答が ON 型 DSGC の応答と同様に運動方向選択性をもつことから(Simpson, 1984)、MTN 投射ニューロンが ON 型 DSGC ではないかと推測されてきた。しかし、本当に ON 型 DSGC が MTN へ投射しているという証拠はなかった。また、ON 型 DSGC 自体の研究も少なく、光応答を記録して ON 型 DSGC であることを確認し、細胞内に蛍光色素等を注入して形態を観察した論文が、ウサギ(He & Masland, 1998)とマウス(Sun *et al.*, 2006)でそれぞれ 1 篇ずつと、ON 型 DSGC 同士のギャップ結合による同期発火を報告した論文(Ackert *et al.*, 2006)が 1 篇存在するだけであった。

2008 年になって、Yonehara らが、マウスの遺伝子操作を行い、発達途中の一時期だけ、しかも網膜の部位特異的ではあるが、初めて ON 型 DSGC を蛍光タンパクでラベルすることに成功した

(Yonehara *et al.*, 2008)。さらに翌年には、ラベルされた神経節細胞から光応答を記録し、実際に ON 型 DSGC であることを証明した(Yonehara *et al.*, 2009)。このことによって初めて、ON 型 DSGC が副視索系に投射していることが証明された。また、2011 年には SAC にチャネルロドプシンを発現させ、SAC を光によって刺激する実験を行った。チャネルロドプシンとは、光を受容することで開く非選択的陽イオンチャネルである。これを特定の細胞に発現させておくと、光を照射することでその細胞内に陽イオンが流入し、細胞を活性化することができる。蛍光タンパクでラベルされた ON 型 DSGC から記録を取りながら、SAC を光によって刺激し、発達のある段階で SAC から ON 型 DSGC への抑制性入力为非対称になることを証明した(Yonehara *et al.*, 2011)。つまり、ON 型 DSGC は特定の方向の SAC とだけシナプス結合しており、それが ON 型 DSGC の運動方向選択性を形成していることを示唆した。さらに、2013 年には逆行性に 1 シナプスだけ越えるトレーサーである変異型狂犬病ウイルスを用いて GCaMP3 というカルシウムインジケーター(カルシウム濃度が上昇すると蛍光を発する)を ON 型 DSGC にシナプス結合している双極細胞と SAC に発現させる実験を行った。細胞が活性化すると細胞内のカルシウム濃度が上昇するので、GCaMP3 の蛍光強度が上昇する。光刺激を呈示した際に、双極細胞の軸索、SAC の樹状突起のどの部分が運動方向選択性をもっているか検討した。その結果、双極細胞の軸索では運動方向選択性は観察されず、ON 型 DSGC の樹状突起において抑制性の入力が入ることで運動方向選択性が形成されていることが示唆された(Yonehara *et al.*, 2013)。

現在、このように ON 型 DSGC に関しても、ON-OFF 型 DSGC と同様に SAC から非対称な入力を受けることによって運動方向選択性が形成されていることを前提に研究が進められている。しかし、Yonehara らの論文の結果からも分かるとおり、SAC 以外にも ON 型 DSGC から逆行性にウイルスでラベルされた細胞を確認することができるため、SAC だけが運動方向選択性の形成に関与しているとは結論することは出来ない。また、ON-OFF 型 DSGC は上丘や LGN に投射するのに対して、ON 型 DSGC は副視索系の核へ投射することから、担っている機能が異なり、運動方向選択性の性質も異なることが推定される。そして、もし性質が異なるのなら、運動方向選択性のメカニズ

ムも異なる可能性がある。

そこで、本研究では、ON 型 DSGC の運動方向選択性形成メカニズムを明らかにすることを目標として、まず、ON 型 DSGC の様々な刺激に対する応答特性を検討し、ON-OFF 型 DSGC と何が異なるのかを検討した(第 2 章)。次に逆行性越シナプス性のトレーサーである狂犬病ウイルスを用いて ON 型 DSGC にシナプス入力を送るアマクリン細胞について検討した(第 3 章)。さらに、狂犬病ウイルスを用いた実験の結果から候補となったアマクリン細胞について分類を試み(第 4 章)、最後に、ON 型 DSGC の運動方向選択性に関与するアマクリン細胞について薬理学的に検討した。

本実験では、脳が大きく、MTN へのトレーサーの注入が比較的容易であり、また遺伝子改変技術が使えることから、ラットを被験体として用いた。

第 2 章 ラットにおける ON 型運動方向選択性細胞の応答特性

1. 目的

本章では、まずラット網膜における ON 型 DSGC の応答特性について検討した。これまでの DSGC の研究は主にウサギ網膜についてのものであった。しかもメカニズムについての研究が大半で、応答特性についての基礎的な研究は DSGC が発見された直後に出されたもの(Barlow *et al.*, 1964; Barlow & Levick, 1965; Oyster, 1968; Oyster *et al.*, 1972; Wyatt & Daw, 1975)以外は、少数存在するだけであり(He & Levick, 2000; Stasheff & Masland, 2002; Chiao & Masland, 2003)、詳細については明らかにされていない。ウサギでは網膜の周辺部よりも、visual streak (霊長類等の中心窩にあたる)に ON 型 DSGC が多く存在しており、ON-OFF 型 DSGC よりも遅い速度の刺激(約 1°/秒以下)によく応答する。しかし、ラットの網膜には中心窩がないので、DSGC が担っている役割が異なっていたり、ウサギ網膜の DSGC とは全く異なる応答特性を持っている可能性がある。そこでまず、ラットにも MTN (Medial terminal nucleus) に投射する ON 型 DSGC があることを確認し、どのような光刺激によく応答するのかを検討することにした。

2. 方法

2-1 動物

被験体としてラット(成体、～300 g、Wistar 系)を用いた。以下全ての実験(第 3 章に記述する実験を除く)は、東京大学の「東京大学動物実験実施マニュアル」を遵守し、東京大学人文社会系研究科動物実験委員会での承認を得て実施された。また、遺伝子組み換え生物等の使用に関しては東京大学第二種使用等拡散防止措置の機関確認・承認を得て実施された。

2-2 トレーサーの注入

ON 型 DSGC を標識するため、ON 型 DSGC の投射先といわれている副視索系の核:MTN (medium terminal nucleus) に逆行性のトレーサー (C-34778, cholera toxin subunit B (recombinant), Alexa Fluor® 647 conjugate, Thermo Fisher Scientific) (CTB-Alexa Fluor 647) を注入した。ラットを麻酔するため、ペントバルビタールナトリウム (東京化成工業) を超純水で 5% (0.5 g/10 ml) に希釈したものを、腹腔内へ体重 1 kg あたり 1 ml (50 mg/kg) 注入した。麻酔が効いたことを確かめた後、頭部の毛をバリカン (Model 605AD, Professional hair clipper, THRIVE) で刈り、脳定位固定装置 (SR-6N, NARISHIGE) にラットを固定した。頭皮を切開して頭蓋骨を露出させ、bregma を基準として、MTN の上部にあたる位置 (座標: ML 1.3 mm, AP -5.4 mm) の頭蓋骨にドリルで穴をあけた。脳表から 7.8 mm の深さの部位にトレーサーを注入した。トレーサーの注入にはハミルトンシリンジ (#80001, 10 μ L, Model 1701 LT, Hamilton) と注射針 (#90130, 30 gauge, 2 in, point style 2, Hamilton) を用いた。トレーサーは、0.2 μ L ずつ 30 秒かけて注入し、合計 1 μ L 注入した。注入終了後より 10 分経過してから、注射針をゆっくりと脳から引き抜いた。頭皮は糸付縫合針 (針: 眼科用角針 No.C13-40, 糸: 黒ナイロン No.4-0, 50 cm, 夏目製作所) で縫合した。

2-3 網膜標本

トレーサーを注入したラットは、トレーサーが逆行性に軸索輸送される時間を考慮して、翌日以降に実験に用いた。実験は全て暗室内において、微弱な赤色光照明下で行った。ラットは約 2 時間暗順応した後、炭酸ガスにより麻酔し、断頭して眼球を摘出した。以下の手続きは全て、95% O₂/5% CO₂ の混合ガスでバブリングした標準生理溶液 (後述) 中で行った。実体顕微鏡 (SMZ-1B, Nikon) 下で観察しながら、メス刃 (No. 12, 替刃メス, フェザー安全剃刀) で眼球に切り込みを入れ、スプリング剪刀 (#15023-10, FST) で周囲を切り、前眼部 (角膜、虹彩、レンズ) を取り除いて眼杯を作成した。眼杯はメス刃 (No. 10, 替刃メス, フェザー安全剃刀) で 4 等分し、ピンセットで色素上皮及び

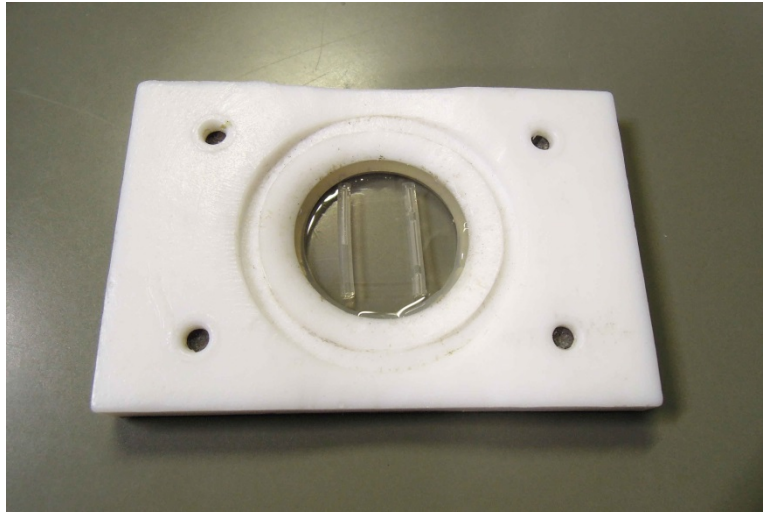
強膜から網膜を剥離した。細胞外液ごと網膜をチェンバー(図 2.1)に移し、神経節細胞層を上にした状態でチェンバーの中央にセットし、液をパスツールピペットで吸い取って網膜を半透膜に張り付けた。網膜片の周囲が浮き上がらないように、L 字型に切ったメンブレンフィルター(AABP04700, Merck Millipore)を 2 枚組み合わせ、網膜の周囲を抑え、上からさらにナイロン糸を張ったコの字型の白金製アンカーを乗せた。素早く細胞外液を満たし、チェンバーを記録用の正立顕微鏡のステージへ移動させた。

2-4 電気生理

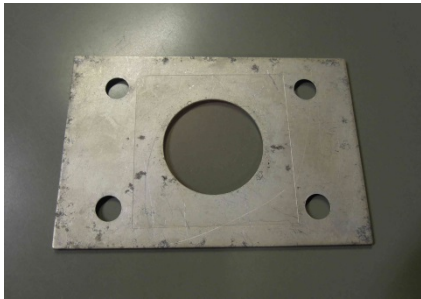
実験中は常に、95% O₂/5% CO₂ の混合ガスでバブリングした標準生理溶液(表 2.1)で網膜を灌流した。ペリスタルティックポンプ(SJ-1211, ATTO)で液を送り出し、ドライ真空ポンプ(DAP-15, ULVAC)を用いて吸引した。灌流の速度は 3 mL/min であった。恒温槽(Neslab RTE-210, Thermo Fisher Scientific)で温度制御した水を灌流用チューブの周囲に流し、標準生理溶液がチェンバー内で 32 から 34°C になるように調節した。チェンバー(Chamber/Dish LIGHT MICROSCOPY Kid #CD-100, Bionique® Testing Laboratories)はテフロン製で、底面は丸く穴の開いた金属板の上にカバーガラスを置いたものであり、下から微分干渉像を観察するための赤外光や、光刺激が呈示できるようになっていた(図 2.1)。このチェンバーを改造して、カバーガラスの上にシリコンチューブ(外形 1.5 mm)2 本によって支持された半透膜(Spectra/Por® 7, #132130, MWCO: 50,000, Spectrum® Laboratories)を張り、その上に標本を載せた。浮かせた半透膜の上に標本を載せることで、電極を細胞に押しつけることで生じる標本へのダメージを緩和することができた。また、半透膜と底面の間に液を通すことができるので、視細胞側への酸素供給が可能となり、より長時間光応答を記録することが可能になった。

細胞の輪郭は、赤外光照明(干渉フィルター(900–950 nm)を通したハロゲンランプ光)下で、正立型の微分干渉顕微鏡(Eclipse E600FN, Nikon)により観察した。顕微鏡像は、IR-CCD カメラ(C2400-79H, Hamamatsu Photonics)の出力をカメラコントローラー(C2400, Hamamatsu

A



B



C

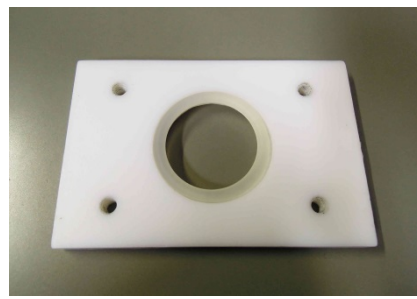


図2.1 チェンバー

A: チェンバー(完成したもの)。テフロン製。中央部分の底面はカバーガラスで、その上にシリコンチューブに支持された半透膜が張ってある。B: チェンバーの底の金属板。中央には穴が開いていて、その部分にカバーガラスをシリコンで張り付けてある。C: Aのテフロン部分を裏返した様子。中央部にはシリコンリングがはめてあり、液が漏れないようになっている。Bの上にさらに半透膜を乗せ、Cをかぶせ、ねじ止めする。半透膜に切り込みを入れて、シリコンチューブを差し込めばAとなる。

表2.1

標準生理溶液	分子量	mM
塩化ナトリウム (NaCl)	58.44	117
塩化カリウム (KCl)	156.01	3.1
炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3)	84.01	23
りん酸二水素カリウム (KH_2PO_4)	136.09	0.5
D(+)-グルコース ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	180.16	6
塩化カルシウム (CaCl_2)	110.98	2
硫酸マグネシウム (MgSO_4)	120.37	1
phenol red		0.0004%
280 mOsm		

表2.2

細胞内液	分子量	mM
グルコン酸カリウム ($\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_4\text{COOK}$)	234.25	120
GEDTA (EGTA) ($\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$)	380.35	0.2
HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$)	238.3	10
塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	203.3	2.5
アデノシン 5'-三リン酸 ニナトリウム塩 (ATP) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{13}\text{P}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)	551.14	2
グアノシン5'-三リン酸三ナトリウム (GTP) ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{Na}_3\text{O}_{14}\text{P}_3$)	589.13	0.5
ホスホクレアチン ニナトリウム塩 水和物 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_5\text{PNa}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)	255.08	10
NEUROBIOTIN™ Tracer ($\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$)	322.8	0.2%
KOHで滴定 pH 7.4, 280 mOsm, $E_{\text{Cl}} = -60.6 \text{ mV}$		

Photonics)に入力してコントラストを増強し、テレビモニタ(C1846-03, Hamamatsu Photonics)でリアルタイムに観察した。まず 4 倍の対物レンズ(Plan 4X/0.10, Nikon)でダメージが少なく、うねりがない平坦な網膜領域を探し、次に、60 倍の水浸レンズ(Fluor 60X/1.00W)に切り替えて細胞を観察した。MTN に注入したトレーサー(CTB-Alexa Fluor 647)でラベルされた神経節細胞を探すため、励起光を照射した。視物質や蛍光蛋白の褪色を防ぐため ND フィルター(ND4, ND16)によって減弱した励起光(620/60 nm)を短時間標本に照射し、蛍光(700/75 nm)像を観察した(フィルタブロック: Cy5, ダイクロイックミラー 660 nm, Nikon)。蛍光像は顕微鏡に取り付けられた高感度モノクロ冷却 CCD カメラ(DS-Qi1Mc, Nikon)によって撮影し、コントロールユニット(DS-U2, Nikon)を通してパソコンに取り込み、ソフトウェア(NIS-Elements, Nikon)によりリアルタイムの動画の制御や画像の取得を行った。

ガラス管電極は、borosilicate ガラス(CNC-1.5, 外径 1.5 mm, 長さ 90mm, Ken Enterprise)をプラー(P-97, Sutter Instrument)で 4 段引きして作成した。細胞内液(表 2.2)を詰めた時の電極の抵抗値は、5~8 M Ω であった。本章では、神経節細胞の膜電位を記録した。長時間安定して応答が記録できるように、細胞内液は生理的条件に近い K⁺を主体とし、ADP にリン酸基を供給して ATP を再生することのできる phosphocreatine を加えた。また、実験後に細胞の形態を詳細に調べるため、細胞染色用トレーサーである Neurobiotin (SP-1120, Vector Laboratories)を加えた。細胞内液は ATP、GTP、phosphocreatine、Neurobiotin を入れない状態の液をフィルター(Millex®-GV, Merck Millipore)でろ過して滅菌して冷蔵保存するか、あるいは、全ての薬品を入れた状態のものを分注して冷凍保存した。液間電位は細胞内液作成時に測定し、あらかじめ差し引いて記録を行った。ガラス管電極に細胞内液を詰める際には、再度内液をフィルター(Millex®-LG, Merck Millipore)で濾過した。ガラス管電極の先端を超純水に浸した後、細胞内液を電極の後端からシリンジで注入した。電極内の気泡は指先でタップして除去した。不閉電極には、Ag-AgCl ペレット(E201, Warner Instruments.)を用いた。チェンバー内にうまく固定されるように、リード線を付けたペレットをテフロンチューブに通し、テフロンチューブをマグネットでステー

ジ上に固定した。ペレットは、チューブの先に高粘度シリコン (KE45T, 信越化学工業) で固定し、リード線に標準生理溶液などがつかないようにマニキュアでチューブとペレットの隙間を塞いだ。

ホールセルクランプ法による膜電位の記録は、パッチクランプ用アンプ (EPC 9/2, HEKA) を、同社のソフトウェア (PATCHMASTER v2.7.3, HEKA) で制御して行った。膜電位応答は 20 kHz のサンプリングレートで A/D 変換して記録した。また、アンプからの出力をオシロスコープ (COR5561, 菊水電子工業) とチャートレコーダー (LINEARCORDER, WR3320, GRAPHTEC Corporation) に分岐し、リアルタイムに膜電位を観察すると共に、記録開始から終了時までの全膜電位変動を記録した。

2-5 光刺激

光刺激は、Psychtoolbox (Brainard, 1997; Pelli, 1997) を利用して MATLAB (The MathWorks) で作成した。刺激は正立顕微鏡のステージ下に設置されたポケットプロジェクター (MPro 120, 3M) により磨りガラス上に投影され、その像が顕微鏡のコンデンサーレンズを介して網膜上に呈示された。光強度を減弱させるため、磨りガラスとコンデンサーレンズの間に ND フィルター (ND1 と ND0.1) を挿入した。網膜を置く焦点面 (半透膜上) での解像度は $1.54 \mu\text{m}/\text{pixel}$ であった。網膜に呈示されている刺激画像は、ファラデーケージ外の液晶モニタ上にも同時呈示して常に確認した。また、刺激呈示による液晶モニタの輝度変化をフォトダイオードで電圧変換してパッチクランプ用アンプ (EPC 9/2) にアナログ入力することによって、光刺激のタイミングと細胞応答を同時記録した。また、光刺激呈示用コンピュータから刺激開始時に MATLAB でシリアルポートから信号を出し、RS232C から TTL レベルへの変換を行って EPC 9/2 に入力した。EPC 9/2 に接続された記録解析用コンピュータは PATCHMASTER によりその信号をトリガーとして使用し、細胞からの光応答記録を開始した。

刺激の光強度は明・暗の 2 値のみを用いた。全画面が暗のときの焦点面の照度は 2.1 mlx であり、全画面が明のときの照度は、 104.4 mlx であった。背景光は暗、バー刺激、全面照射刺激は明を用

いた。まず網膜神経節細胞が ON 型か ON-OFF 型かを識別するために、全面照射光を1秒間呈示した。次に記録している細胞体の位置を中心として、 $800 \times 200 \mu\text{m}$ のバーがその短軸に沿って動く刺激を呈示した。運動方向は45度間隔で8方向設定した。また、結果において特に明記していない場合は、各運動方向でバーの出現のタイミングが同じになるように、細胞体を中心とした直径 $800 \mu\text{m}$ の円より外側の領域にマスク(暗)を掛けた。

運動方向選択性の維持に必要な刺激領域を検討する実験(結果3-2)では、マスクの内径を直径 $100 \mu\text{m}$ から $800 \mu\text{m}$ まで変化させた。また、DSGC の刺激速度依存性を検討する実験(結果3-3)では、マスクの内径は $800 \mu\text{m}$ に固定しておき、バー刺激の速度を $30 \mu\text{m}/\text{秒}$ から $1,920 \mu\text{m}/\text{秒}$ まで変化させた。最後に矩形波刺激に対する応答を検討する実験(結果3-4)では、 $400 \mu\text{m}/\text{cycle}$ の矩形波縞を $300 \mu\text{m}/\text{秒}$ の速度で運動させた。

2-6 形態観察

アビジンは卵白中に存在するタンパク質であり、ビタミンの一種であるビオチンに対して抗原抗体反応の 100 万倍以上の親和力を持つ。この特性を利用して、細胞の形態を可視化した。細胞内には、トレーサーとして、ビオチンのアミノ誘導体である Neurobiotin をガラス管電極から導入した(「2-4電気生理」参照)。Streptavidin はアビジンに類似した細菌由来のタンパク質で、アビジンよりも非特異的結合が少ない。この Streptavidin に蛍光色素である Cy3 を結合させた物質を Neurobiotin と反応させることによって、記録した神経節細胞を可視化した。具体的には、記録後、網膜片を 4% Paraformaldehyde 液(表 2.6)で 30 分固定し、その後 0.1 M の PBS(表 2.5)で 3 回洗浄してから、Streptavidin 液(表 2.7)で一晩反応させた。

いくつかの網膜片では、Neurobiotin を導入した神経節細胞が内網状層において樹状突起を伸ばしている亜層(a 層(OFF 層)と b 層(ON 層))を同定するために、starburst amacrine cell (SAC)を免疫染色した。SAC には ON 層に樹状突起をのぼすサブタイプと OFF 層に樹状突起をのぼすサブタイプが存在するため、SAC を染色すると、内網状層の特定の 2 亜層が染まる。これを

基準として Neurobiotin を導入した神経節細胞の樹状突起の位置を調べた。具体的には、まず、抗体と組織・細胞中のタンパクの非特異的反応を防ぐために、90 分間ブロッキングを行った(表 2.8)。次に網膜を 1 次抗体液(表 2.9)に浸け、4°C で 1 週間反応させた。その後、PBS で 3 回洗浄し、2 次抗体液(表 2.10)に浸け、室温で 2 時間反応させた。最後に PBS で 3 回洗浄して、網膜をスライドガラスに並べ、余分な水分を吸い取ってから VECTASHIELD(Vector Laboratories)で封入した。蛍光像の観察、撮影には、東京大学内の「東大・ニコンバイオラボ」に設置された共焦点レーザー顕微鏡システム(A1, Nikon)を使用した。神経節細胞の全体像の撮影には、20 倍の対物レンズ(Plan Apo VC 20X DIC, Nikon)を使用した。内網状層における樹状突起の位置を検討する場合(図 2.4B)は、60 倍の油浸レンズ(Plan Apo VC 60X Oil DIC, Nikon)により 0.328 μm ステップで深さ方向にフォーカス面を移動させながら撮影し、ソフトウェア NIS-Elements(Nikon)で 3 次元画像に再構成した。

2-7 解析

神経節細胞の形態画像は、GIMP 2 により深さ方向の画像を重ね、グレースケールに変換し、コントラストを調整した。膜電位の波形データの解析は IGOR pro(WaveMetrics)で行い、レーダープロット等のグラフは Excel(Microsoft)により作成した。統計には Excelと ORIGIN Pro(Lightstone)を使用した。

Direction selectivity index(DSI)は、以下のように計算した。

$$\text{DSI} = \frac{|\sum \vec{v}_i|}{\sum |\vec{v}_i|}$$

バー刺激をある方向 i に運動させた時の神経節細胞の応答を、方向(刺激の運動方向)と大きさ(スパイク数)をもつベクトル \vec{v}_i と考える。ここで、 $|\vec{v}_i|$ はある運動方向 i におけるスパイク数を指すので、分母は全運動方向で得られたスパイク数の合計となる。そして、分子は全方向のベクトル和の絶対値(大きさ)を意味する。神経節細胞がある運動方向のときだけ応答した場合、ベクトル和はその運動方向で大きくなる。そのベクトル和の大きさをすべての運動方向のスパイク数で正規化した値が DSI

表2.3

0.2 M リン酸緩衝液 (phosphate buffer : PB)	分子量	1 L
りん酸水素二ナトリウム・12水 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	358.14	57.4 g
リン酸水素ナトリウム二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	156.01	6.6 g
緩衝液とは、pHをある程度一定に保つための溶液で、弱酸とその共役塩基や弱塩基とその共役酸を混合したものである。		

表2.4

0.1 M リン酸緩衝液 (phosphate buffer : PB)	分子量	1 L
0.2 M PB		500 mL
		in 超純水

表2.5

0.1 M リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffer saline : PBS)	分子量	1 L
0.2 M PB		500 mL
塩化ナトリウム (NaCl)	58.44	8 g
		in 超純水

表2.6

4% Paraformaldehyde液	分子量	200 mL
Paraformaldehyde (PFA)		8 g (4%)
1規定 水酸化ナトリウム (NaOH)		数滴
0.2 M PB		100 mL
		in 超純水
PFAは80 mLくらいの超純水を加えて熱して溶かす。		

表2.7

Streptavidin液	
Streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate	1:300 ¹⁾
Triton X-100 ²⁾	0.5%
	in PBS

1) 1:300は300倍希釈という意味。

2) 界面活性剤、抗体等の細胞への浸透をよくする。

表2.8

blocking液	
Normal Donkey Serum (NDS) ³⁾	3%
アジ化ナトリウム (NaN ₃) ⁴⁾	0.1%
	in PBS

3) ロバ抗体の非特異的な結合を防ぐ。

4) 防腐剤。

表2.9

1次抗体液	
ヤギ抗ChAT抗体 (Anti-Choline Acetyltransferase Antibody) ⁵⁾	1:200
Normal Donkey Serum (NDS)	1%
Triton X-100	0.33%
アジ化ナトリウム (NaN ₃)	0.033%
	in PBS

5) Starburst amacrine cell (SAC)を染色するための抗体。SACは網膜内で唯一アセチルコリンを放出する細胞なので、アセチルコリンの合成酵素であるcholine acetyltransferase (ChAT) の抗体で染色する。

表2.10

2次抗体液	
Cy TM 3 ロバ抗ヤギIgG (Cy TM 3 Donkey Anti-Goat IgG)	1:200
Normal Donkey Serum (NDS)	1%
Triton X-100	0.33%
アジ化ナトリウム (NaN ₃)	0.033%
	in PBS

である。

自己相関関数 $A(\tau)$ は、矩形波刺激の運動開始から 7 秒間の膜電位応答 P から以下のように計算した。

$$A(\tau) = \frac{\frac{1}{N} \sum_t (P(t) - \bar{P})(P(t+\tau) - \bar{P})}{\sigma^2}$$

ここで、 $P(t)$ はある時刻 t の膜電位を表し、 τ は時間シフトで ± 3 秒とした。 \bar{P} は 7 秒間の P の平均を表し、 N は P の 7 秒間におけるデータポイント数、 σ^2 は P の分散を表す。あらかじめデータからは平均を差し引き、 \bar{P} が 0 となる状態で計算した。

3. 結果

3-1 MTN に投射する網膜神経節細胞の形態

副視索系の核 MTN (medium terminal nucleus) に注入した逆行性のトレーサーである CTB-Alexa Fluor 647 により細胞体が標識された網膜神経節細胞 (図 2.2) からホールセル記録を行い、電極内から導入した Neurobiotin を実験後に可視化し、細胞の形態を観察した (図 2.3, 2.4)。何れの神経節細胞も、樹状突起は主に内網状層の b 層 (ON 層) に広がっていた (図 2.4B) ので、ON 型神経節細胞であると考えられる。樹状突起が広がる範囲は直径が平均 $477 \pm 13.3 \mu\text{m}$ ($n = 21$ cells) であった。樹状突起は細胞体から離れるほど向きを変え、うねる傾向があった。

3-2 運動方向選択性の維持に必要な光刺激領域

MTN に投射している網膜神経節細胞が、運動方向選択性を示すか否かを検討した。バー刺激を 8 方向に動かしたところ、運動方向選択性を示す神経節細胞を見いだすことができた (図 2.5A)。しかし、小さな核である MTN へ正確にトレーサーを注入することが容易ではないため、蛍光標識されていても、運動方向選択性を示さない神経節細胞もあった。また、標本の状態が悪く、光応答が明確でないもの、運動方向選択性がはっきりしない神経節細胞もあった。本章の目的は、ON 型

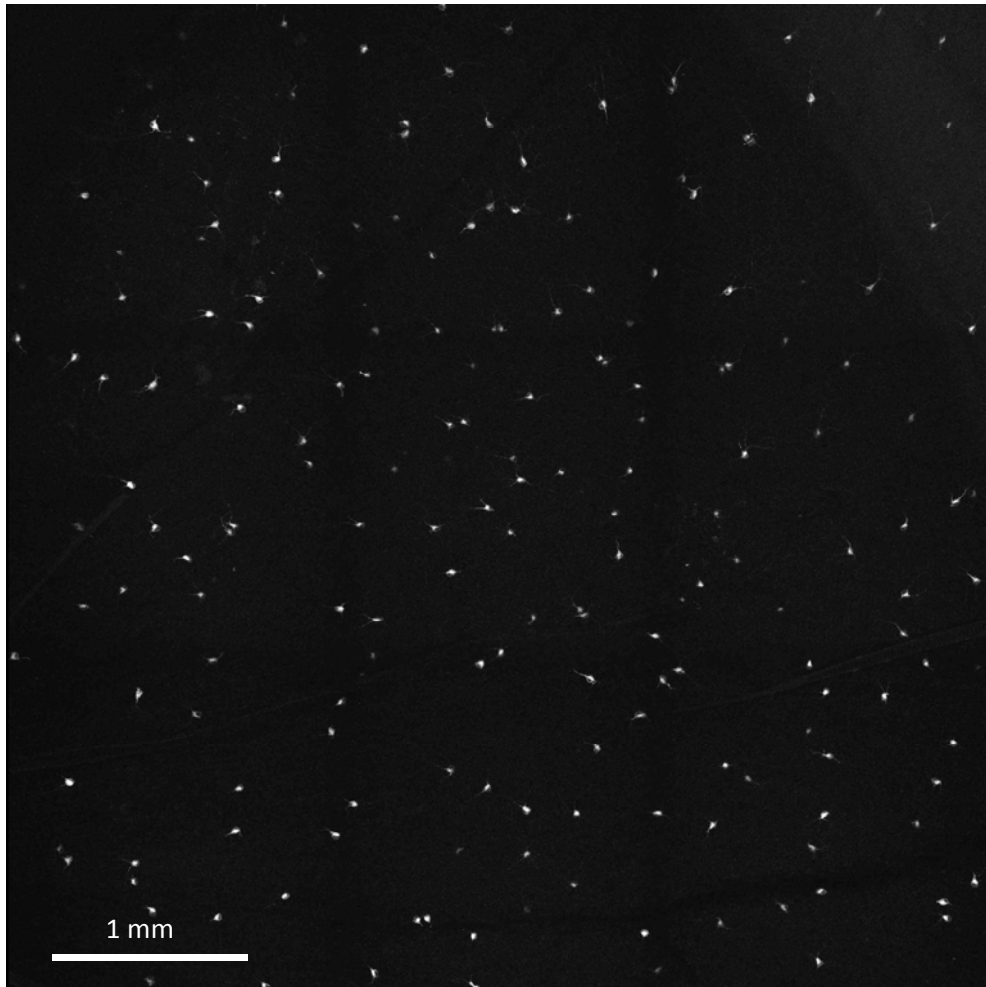


図2.2 MTN投射ニューロン

ラットのMedial terminal nucleus (MTN)に逆行性のトレーサー (CTB-Alexa Fluor 647)を注入し、翌日にラットの網膜を観察した。MTNに投射している神経節細胞が蛍光色素 (Alexa Fluor 647)によってラベルされている。

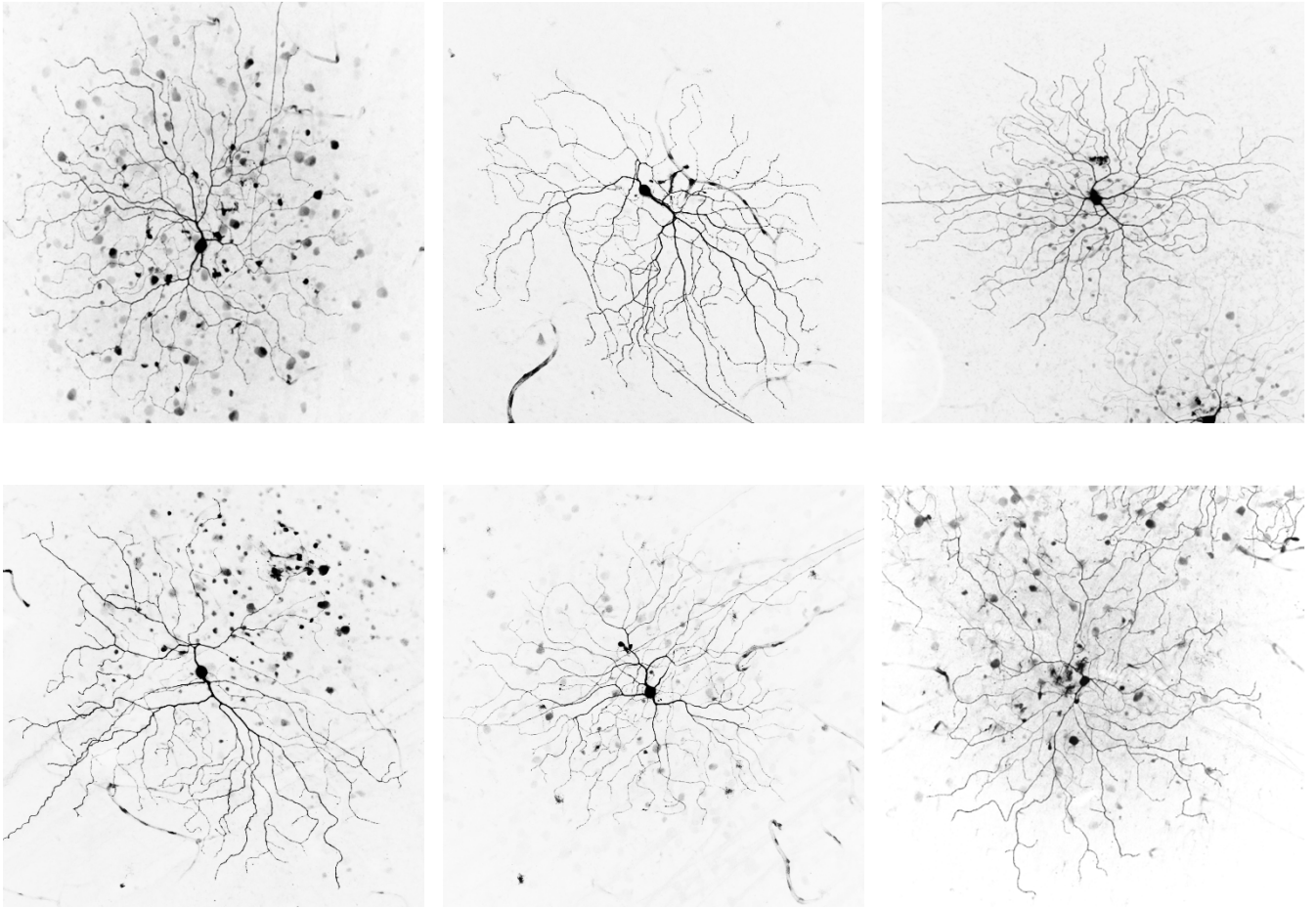
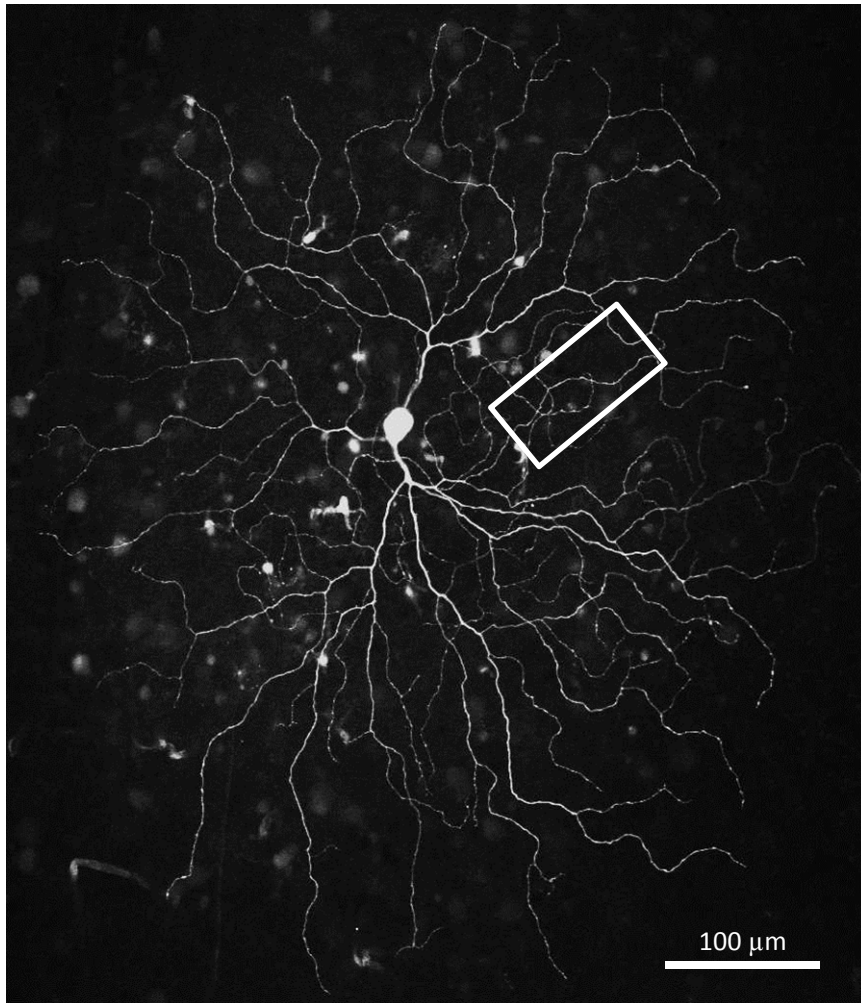


図2.3 MTN投射ニューロンの詳細な形態

図2.2のようにラベルされている細胞の一つにパッチクランプ法を適用して、ピペットからNeurobiotinを導入した。実験後、固定し染色して、共焦点レーザー顕微鏡システムにより観察、撮影した。

A



B

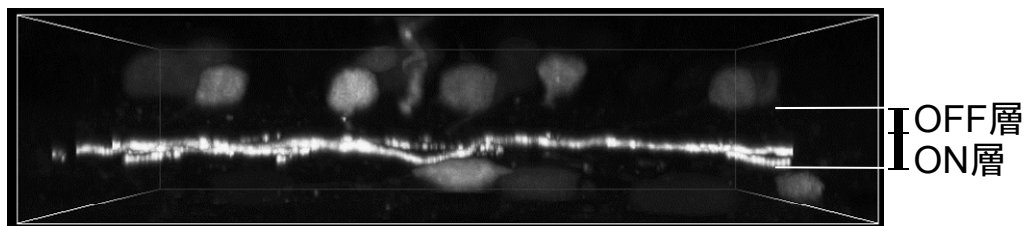
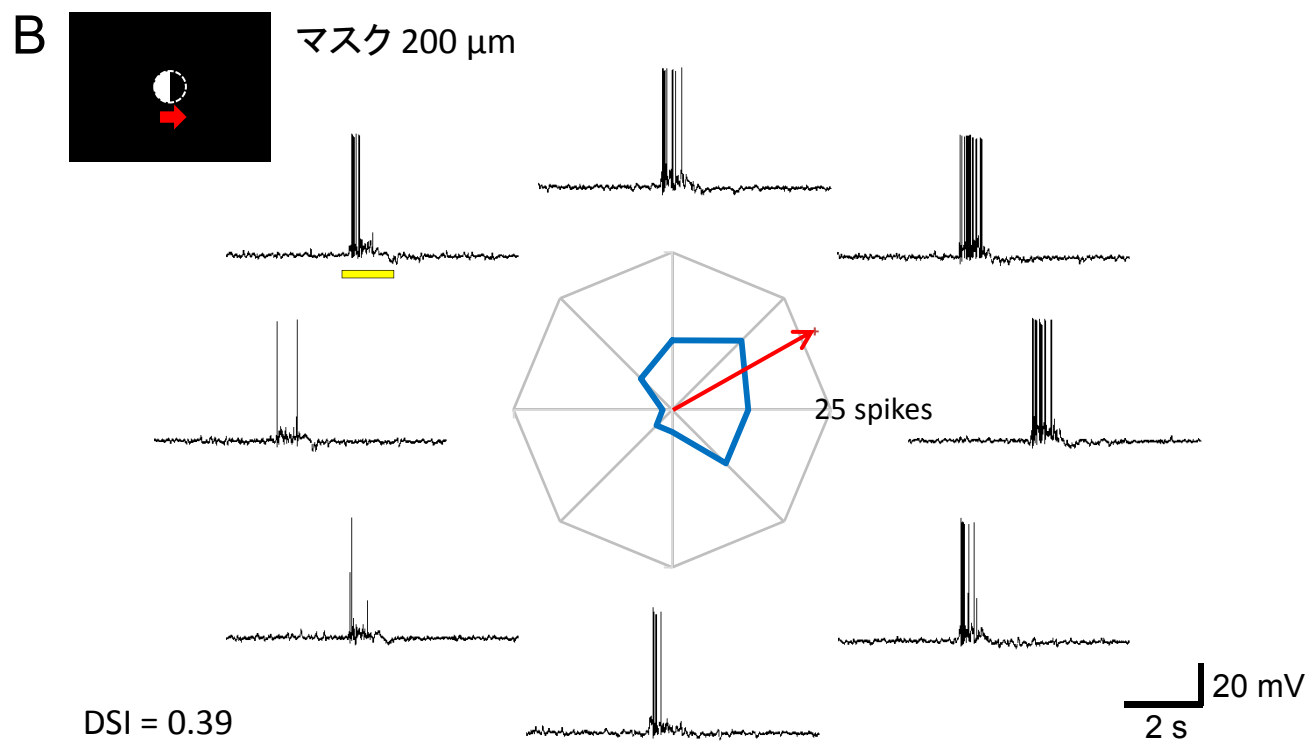
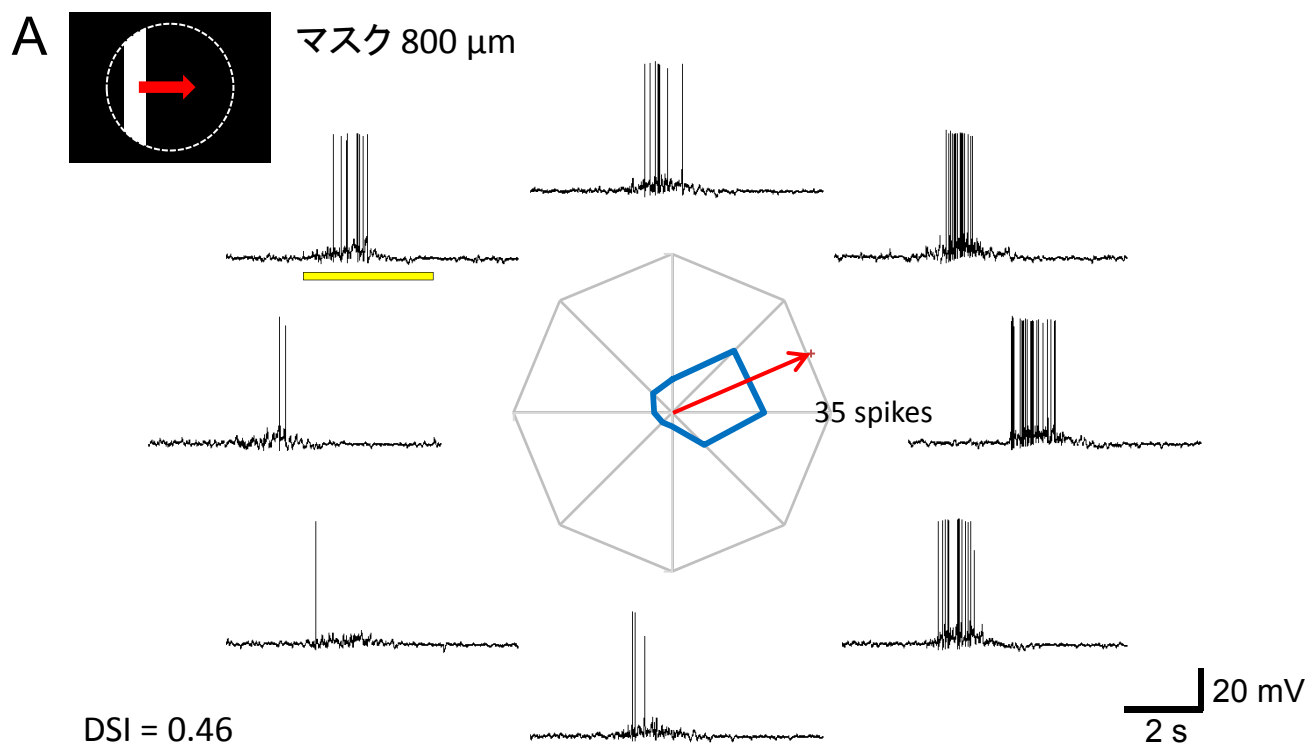


図2.4 実際に光応答が記録されたMTN投射ニューロンの例

A: 図2.3の左上と同じ。応答からON型DSGCであることが確認できた。B: Aの四角で囲んだ部分について、深さ方向に写真を撮り、ソフトウェア上で3次元に再構成したもの。樹状突起がON層にあることが分かる。



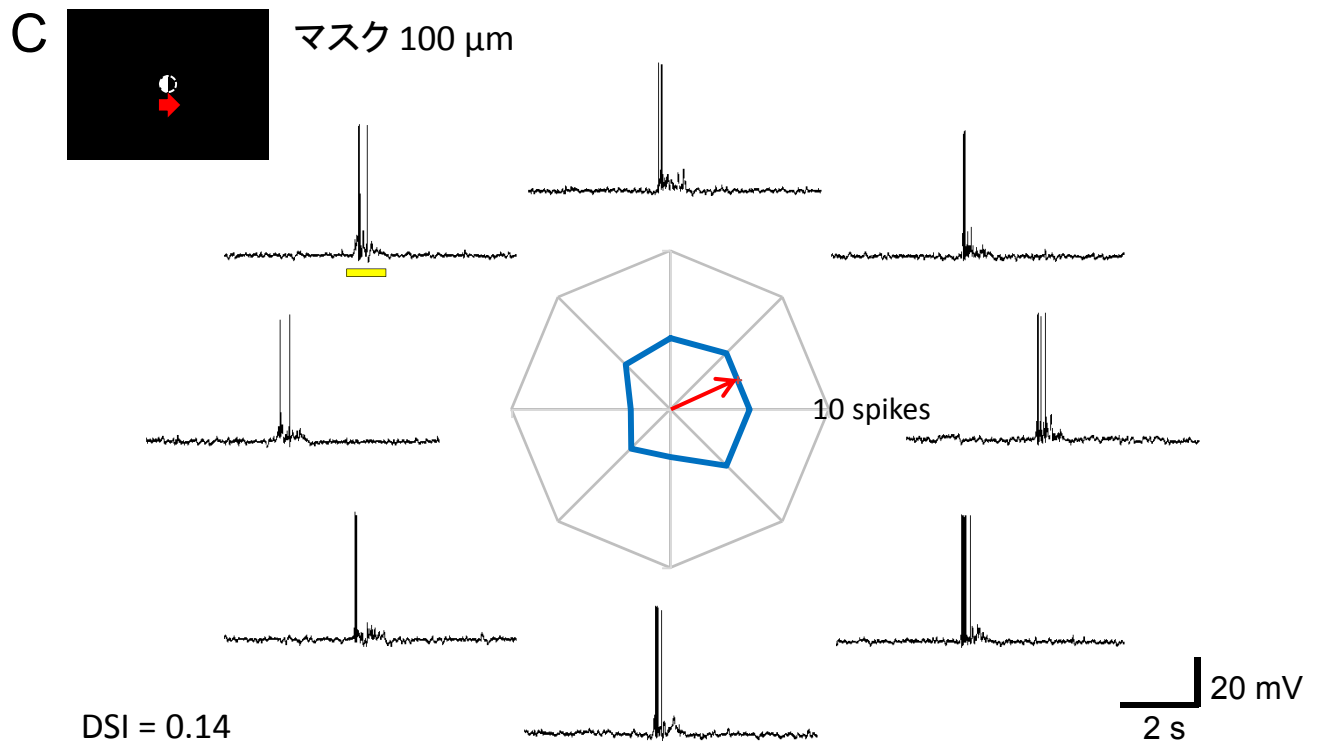


図2.5 ON型DSGCにおいて、刺激領域の広さが運動方向選択性に与える影響

周辺部にマスクを掛けて刺激領域を制限し、運動方向選択性を維持するのにどのくらいの領域が必要なのか検討した。ON型DSGCでは、直径200 μm 以上の領域があれば、運動方向選択性が維持された。A: マスク800 μm 条件(刺激が直径800 μm の範囲に出現する条件)。左上: 刺激の模式図。バーは8方向に動かした。中央: 呈示された刺激の運動方向でスパイク数をプロットしたレーダーグラフ。3試行分の平均。赤矢印はベクトル和。周辺: その運動方向刺激の呈示時に記録された膜電位波形の例。黄色バー: 刺激呈示時間。B: マスク200 μm 条件。レーダーグラフは2試行分の平均。C: マスク100 μm 条件。レーダーグラフは2試行分の平均。

DSGC だけが MTN に投射していることを証明することではなく、ラット網膜の ON 型 DSGC の特性を検討することなので、スパイク応答から Directional sensitivity index (DSI) (方法2-7参照)を算出し、DSI が 0.3 以上のもの(Kay *et al.*, 2011)を ON 型 DSGC とし、解析を行った。

ON 型 DSGC が運動方向選択性を示すのに必要な刺激面積を調べた。ウサギ網膜の ON-OFF 型 DSGC は、受容野内で僅か $1/4^\circ$ エッジを動かしただけでも運動方向選択性を示す(Barlow & Levick, 1965)。つまり、ある方向にエッジを動かした場合には応答するが、逆の方向では応答しない。そこで、ラットの ON 型 DSGC について調べるために、記録細胞の細胞体を中心に、刺激の出現範囲を決め、その周囲にマスクを掛けた。刺激が直径 800 μm の範囲に出現する条件(マスク 800 μm 条件)では、どの細胞も明確に運動方向選択性を示した(図 2.5A, 2.6A)。運動方向選択性はマスク 200 μm 条件まで観察された(図 2.5B, 2.6A)。マスク 100 μm 条件では、選好方向の刺激でスパイク数が減少してしまい、DSI が小さくなった。(図 2.5C, 2.6A)。マスク条件の違いによるスパイク数の変化を合わせて見てみると(図 2.6B)、マスク 200 μm 条件までは、スパイク数の多少に関わらず、DSI が 0.3 以上に維持されていた。特にマスク 200 μm 条件では、スパイク数が減っていても DSI が維持されていることから、刺激面積が小さくて興奮性の入力が少ない条件でも、非選好方向の刺激により ON 型 DSGC に抑制性の入力があったことが推測される。

比較のためにラット網膜の ON-OFF 型 DSGC についても運動方向選択性を示すのに必要な刺激領域を調べた。ラット網膜において、様々なマスク条件で運動方向選択性を検討したところ、マスク 800 μm 条件、500 μm 条件では DSI は 0.3 以上に維持されたが、300 μm 条件、200 μm 条件では DSI は低下する傾向を示した(図 2.7, 2.8, 2.9)。図 2.7C に示されている通り、マスク 200 μm 条件では非選好方向でスパイク数が増加し、DSI が低下していた。スパイク数との関係で考えると、ON 応答、OFF 応答ともに、スパイク数はマスク 200 μm 条件で最大となり、300 μm 条件でもスパイク数は維持されていたが、何れの条件でも DSI は低下していた(図 2.8, 2.9)。つまり、ON-OFF 型 DSGC がよく応答する条件では、非選好方向の刺激に対してスパイクが増加した結果、DSI が低下したと考えられる。ただし、DSI が低下する条件において、非選好方向の刺激で抑制性入力がなく

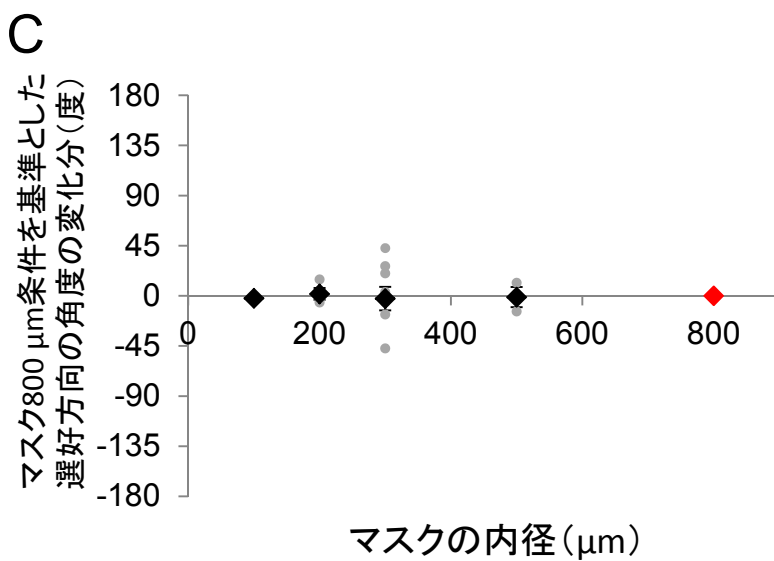
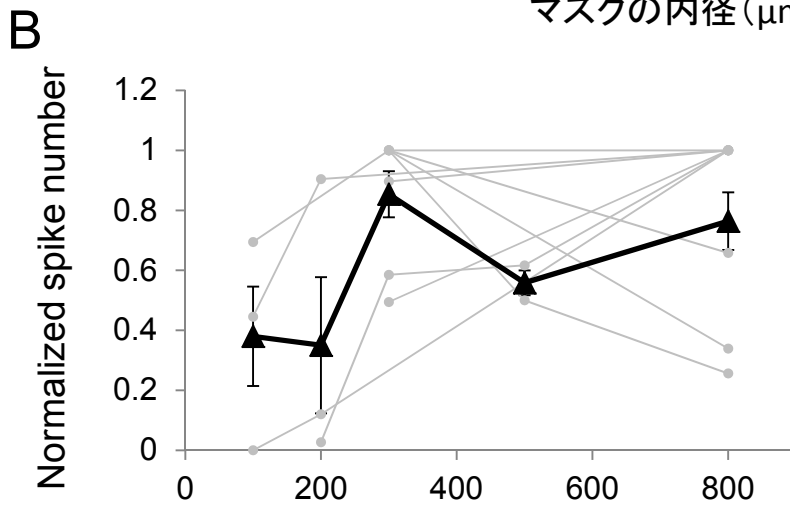
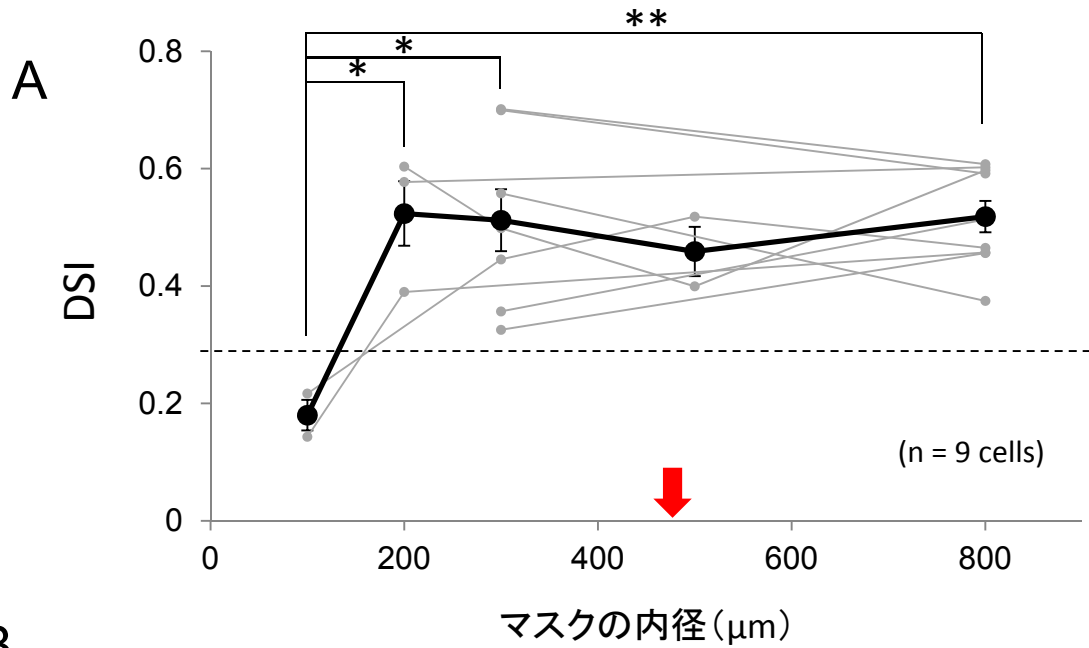
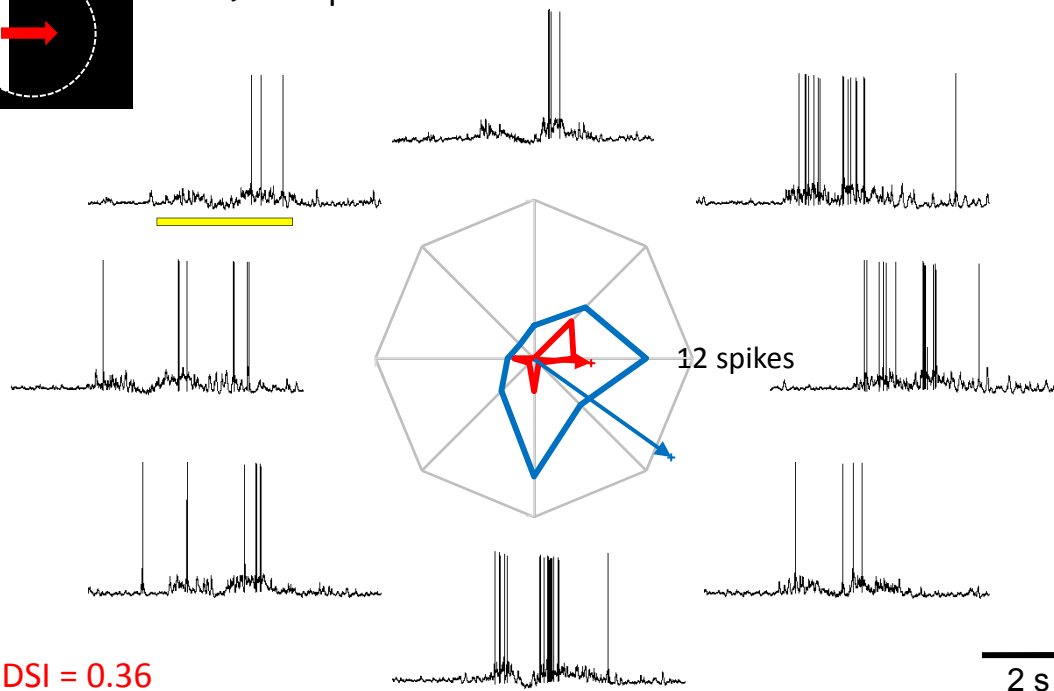
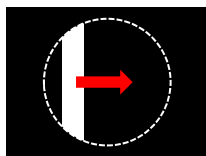


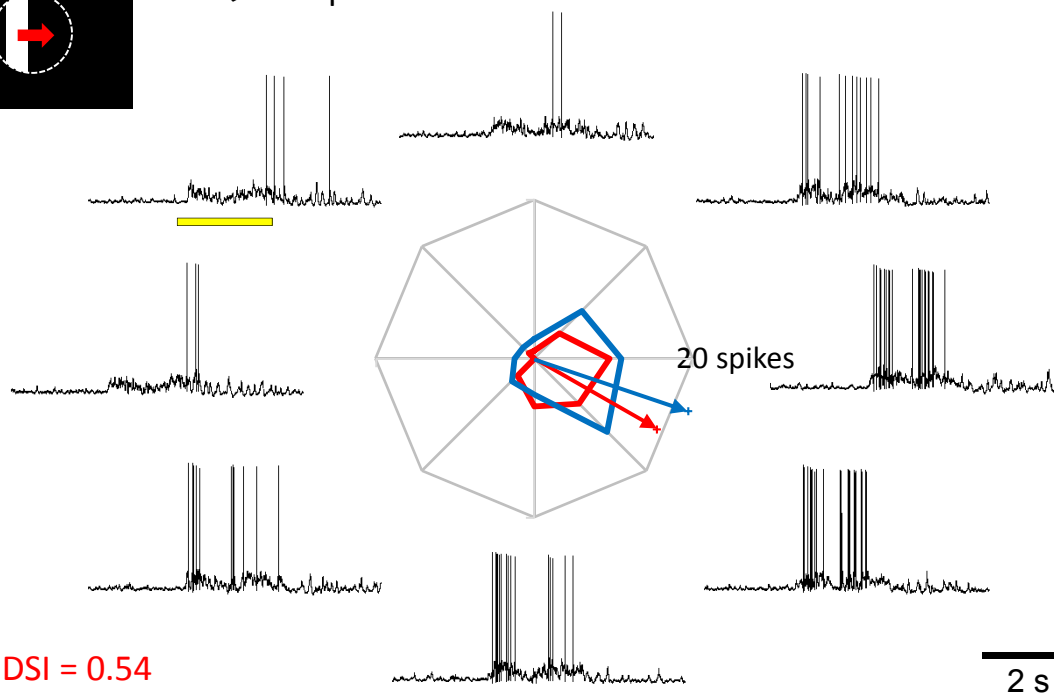
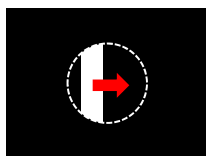
図2.6 刺激領域の変化がON型DSGCIに与える影響

A: マスクの内径を変化させたときのDSIの変化。赤矢印は、ON型DSGCIのdendritic fieldの平均値を指す。B: マスクの内径を変化させたときの、スパイク数の変化。スパイク数は、各細胞ごとに最大値で正規化した。C: マスクの内径を変化させたときの、選好方向の変化。マスク800 μm 条件の選好方向を基準として、各条件における選好方向がどのくらい変化したのかを示している。

A マスク 800 μm



B マスク 500 μm



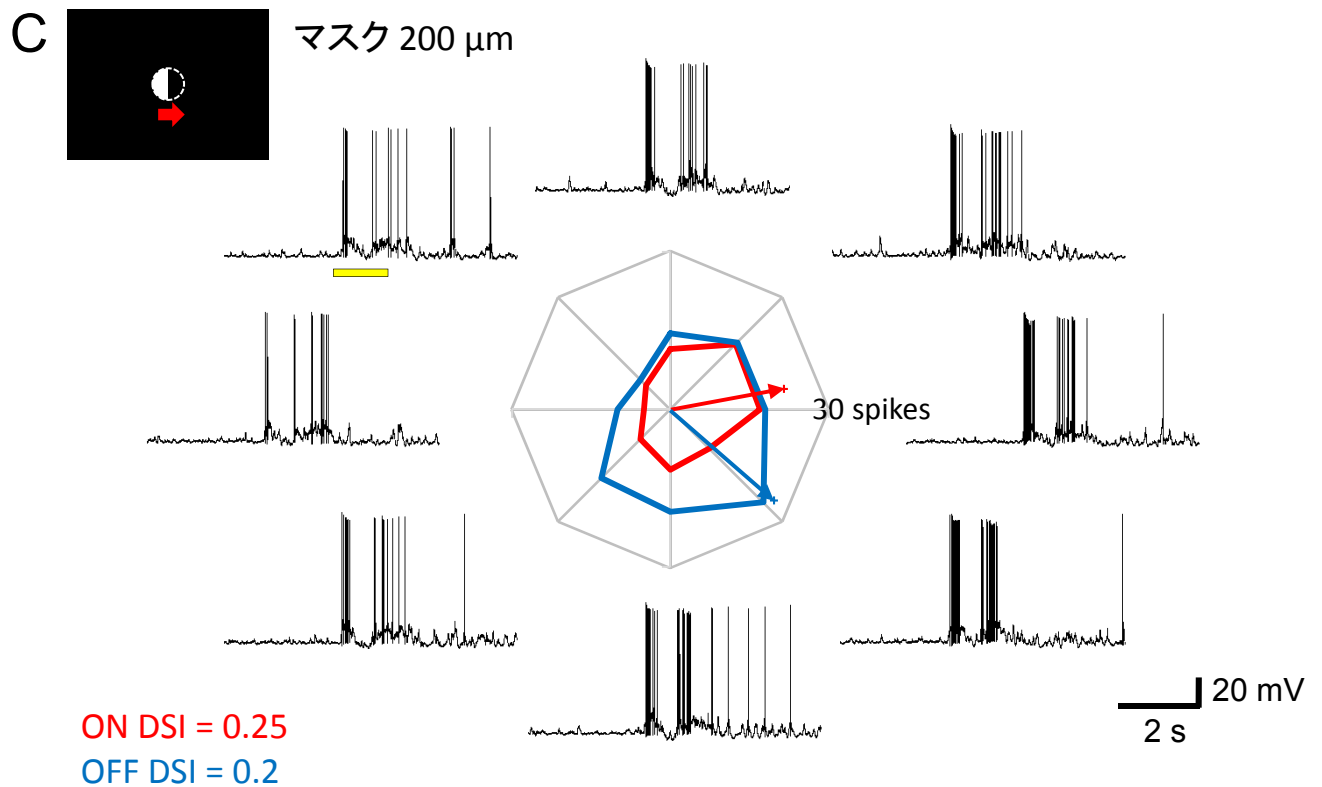


図2.7 ON-OFF型DSGCにおいて、刺激領域の広さが運動方向選択性に与える影響

周辺部にマスクを掛けて刺激領域を制限し、運動方向選択性を維持するのにどのくらいの領域が必要なのか検討した。ON-OFF型DSGCでは、運動方向選択性を維持するのに、直径500 μm 以上の領域が必要だった。A: マスク800 μm 条件(刺激が直径800 μm の範囲に出現する条件)。左上: 刺激の模式図。バーは8方向に動かした。中央: 各運動方向条件において発生したスパイク数をプロットしたレーダーグラフ。2試行分の平均。赤はON応答、青はOFF応答を示す。矢印はベクトル和。周辺: その運動方向刺激の呈示時に記録された膜電位波形の例。黄色バー: 刺激呈示時間。B: マスク500 μm 条件。C: マスク200 μm 条件。

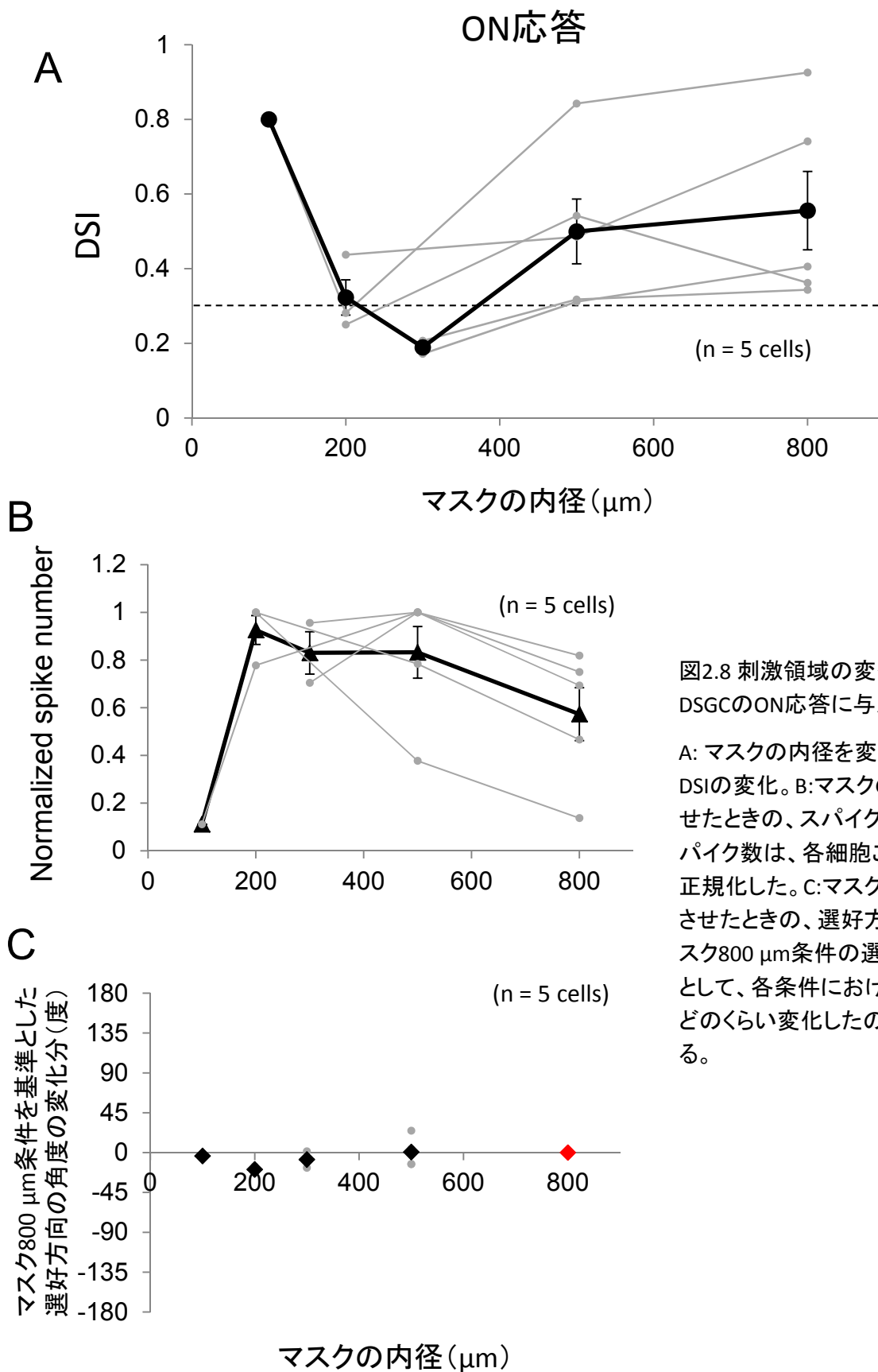


図2.8 刺激領域の変化がON-OFF型DSGCのON応答に与える影響

A: マスクの内径を変化させたときのDSIの変化。B: マスクの内径を変化させたときの、スパイク数の変化。スパイク数は、各細胞ごとに最大値で正規化した。C: マスクの内径を変化させたときの、選好方向の変化。マスク800 μm 条件の選好方向を基準として、各条件における選好方向がどのくらい変化したのかを示している。

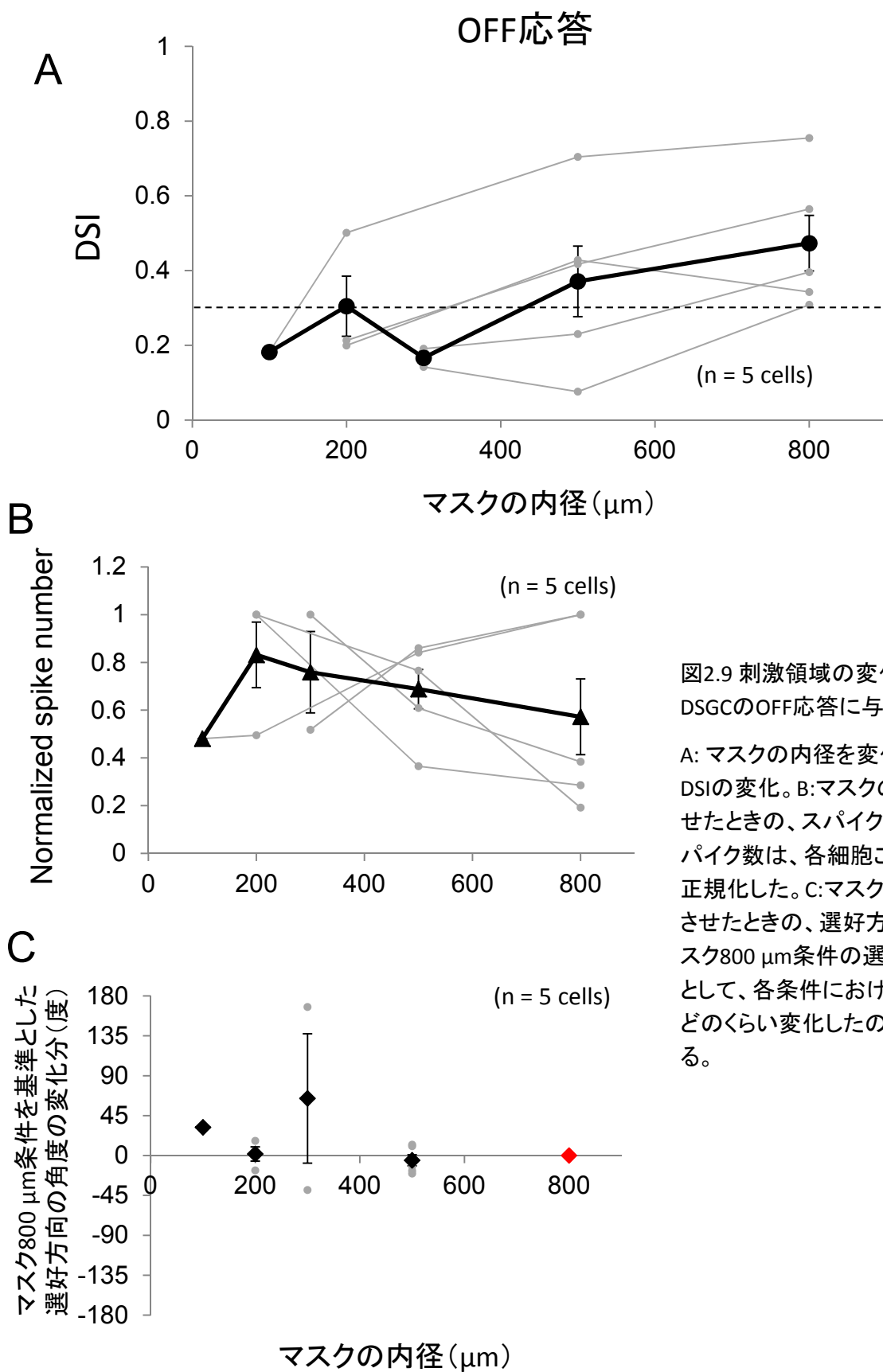


図2.9 刺激領域の変化がON-OFF型 DSGCのOFF応答に与える影響

A: マスクの内径を変化させたときの DSI の変化。B: マスクの内径を変化させたときの、スパイク数の変化。スパイク数は、各細胞ごとに最大値で正規化した。C: マスクの内径を変化させたときの、選好方向の変化。マスク800 μm 条件の選好方向を基準として、各条件における選好方向がどのくらい変化したのかを示している。

なったかどうかは、この実験結果から判断することはできない。スパイクが発生するかどうかは興奮性入力と抑制性入力のバランスによるので、興奮性の入力が大きかった場合、抑制性の入力があったにも関わらずスパイクが発生したという可能性は否定できない。ON 応答についていうと、マスク 100 μm 条件では DSI が非常に高くなったが、これは、刺激領域が狭すぎてスパイク数が極端に減少した結果生じたものと思われる。つまり、選好方向への刺激でスパイクが 1~2 回生起したために見かけ上 DSI が大きくなったのであろう。

これらの結果から、ラット網膜では ON 型 DSGC と ON-OFF 型 DSGC ではその機能に大きな違いがあると思われる。ON 型 DSGC はマスク 200 μm 条件から 800 μm 条件まで高い運動方向選択性が維持されたのに対して、ON-OFF 型 DSGC では、マスク 300 μm 条件以下では高い運動方向選択性が維持されなかった。したがって ON 型 DSGC は様々な大きさの刺激の運動方向についての情報を脳へ伝えることができるが、ON-OFF 型 DSGC は直径 500 μm 以上の大きな刺激の運動方向に関する情報を脳へ伝えている可能性が示唆された。

3-3 DSGC の速度依存性

ウサギの運動方向選択性細胞では、ON 型と ON-OFF 型 DSGC で速度依存性が異なることが報告され(Oyster, 1968)、それが遅い眼球運動と、速い眼球運動に対応することが示唆されている(Collewijn, 1969, Oyster *et al.*, 1972; Wyatt & Daw, 1975)。ラットでも ON 型と ON-OFF 型で同様の速度依存性の違いがあるか否か検討するため、バー刺激の運動速度を 30 $\mu\text{m}/\text{秒}$ から 1,920 $\mu\text{m}/\text{秒}$ まで変化させて呈示した。ウサギでは ON 型 DSGC は $1^\circ/\text{秒}$ 以下の遅い刺激によく応答すると報告されているが、ラットの ON 型 DSGC は、30 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (およそ $0.5^\circ/\text{秒}$)、60 $\mu\text{m}/\text{秒}$ ($1^\circ/\text{秒}$) の刺激にはあまり応答しなかった(図 2.10A, 2.12A)。刺激の速度が上がるにつれ、スパイク数が増加し、480 $\mu\text{m}/\text{秒}$ のときスパイク数が最多となった。また刺激の速度が上がるにつれ、スパイク間隔が短くなった。したがって時間に対して累積スパイク数をプロットしてみると、刺激の速度が上がるにつれて、傾きが大きくなった(図 2.10B)。バー刺激の場合、運動速度を上げていくと刺激

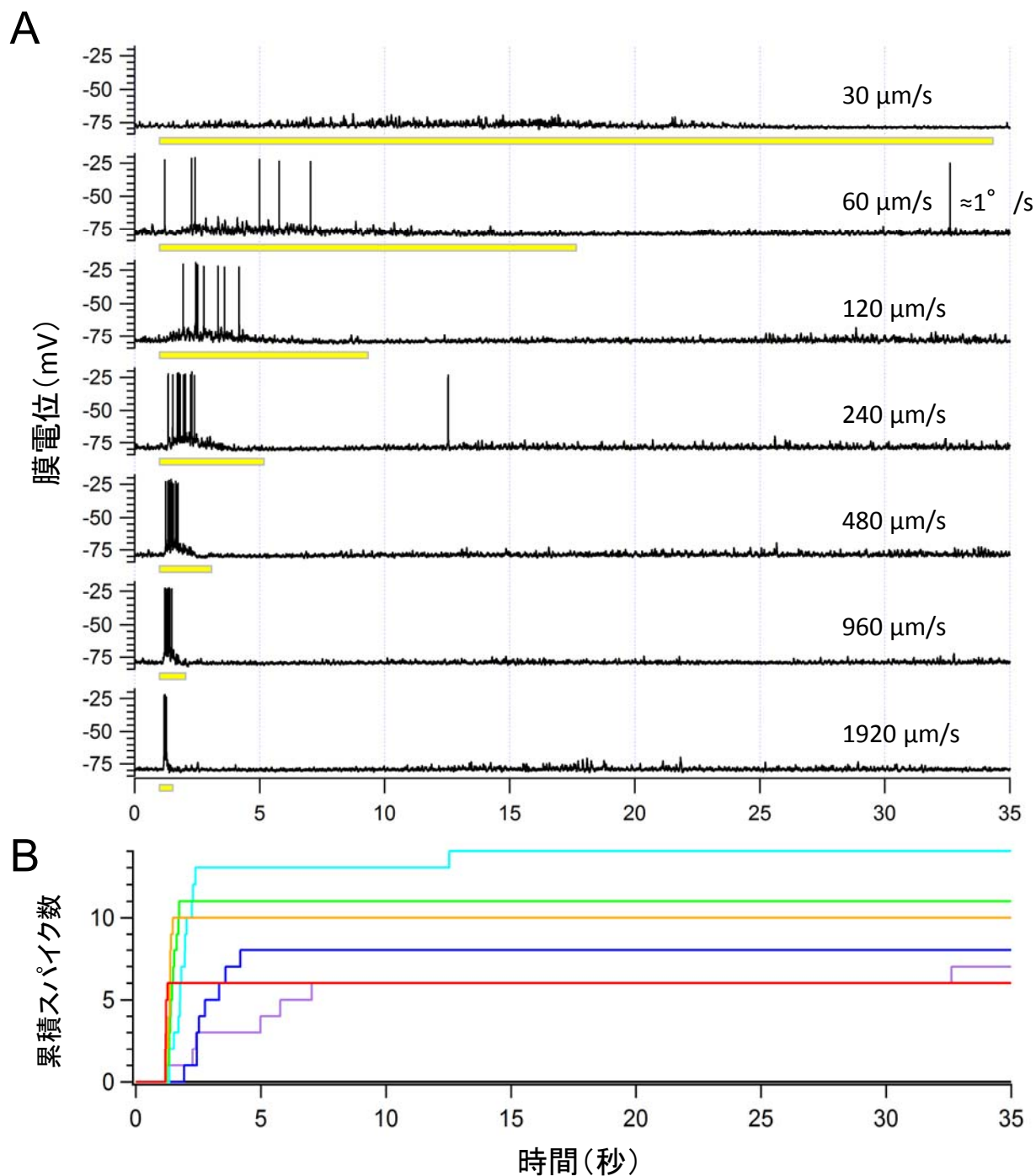
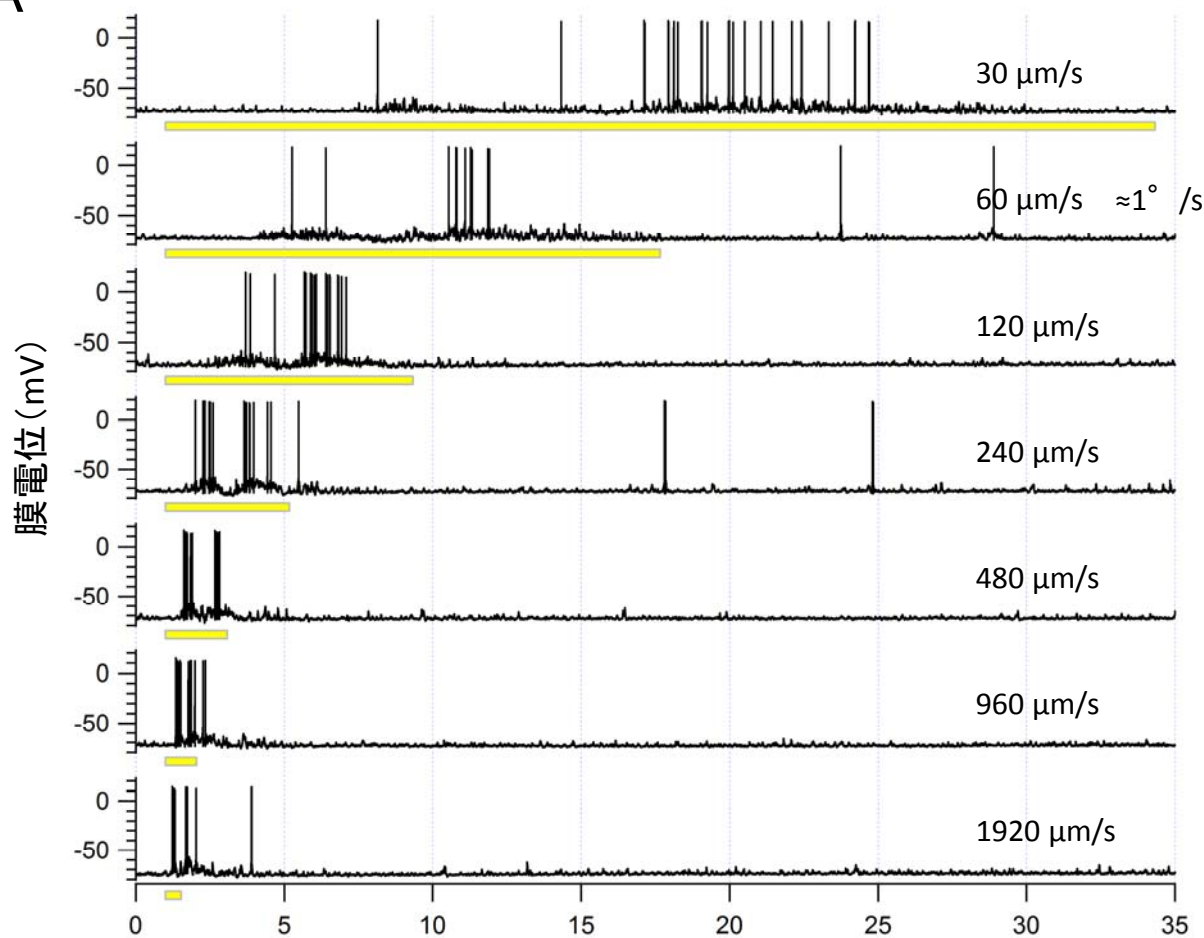


図2.10 様々な速度のバー刺激を呈示したときのON型DSGCの応答

A: 様々な速度のバーを呈示した時のON型DSGCの膜電位波形。黄色の線分はバー刺激が呈示されている時間帯を指す。B: Aの波形からスパイクをカウントし、時間に対して累積スパイク数をプロットした。色の違いが刺激条件の違いを表す。黒: 30 $\mu\text{m/s}$, 紫: 60 $\mu\text{m/s}$, 青: 120 $\mu\text{m/s}$, 水色: 240 $\mu\text{m/s}$, 緑: 480 $\mu\text{m/s}$, 橙: 960 $\mu\text{m/s}$, 赤: 1920 $\mu\text{m/s}$.

A



B

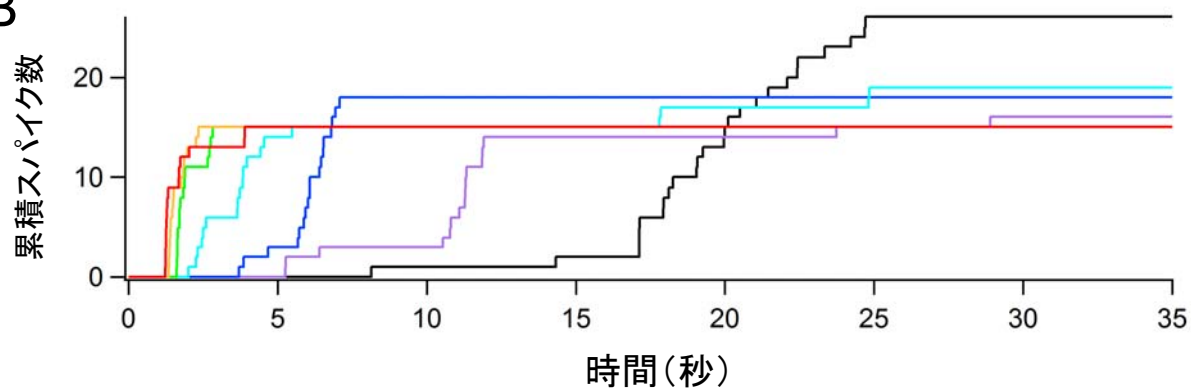


図2.11 様々な速度のバー刺激を呈示したときのON-OFF型DSGCの応答

A: 様々な速度のバーを呈示した時のON-OFF型DSGCの膜電位波形。黄色の線分はバー刺激が呈示されている時間帯を指す。B: Aの波形からスパイクをカウントし、時間に対して累積スパイク数をプロットした。色の違いが刺激条件の違いを表す。黒: 30 $\mu\text{m/s}$, 紫: 60 $\mu\text{m/s}$, 青: 120 $\mu\text{m/s}$, 水色: 240 $\mu\text{m/s}$, 緑: 480 $\mu\text{m/s}$, 橙: 960 $\mu\text{m/s}$, 赤: 1920 $\mu\text{m/s}$ 。

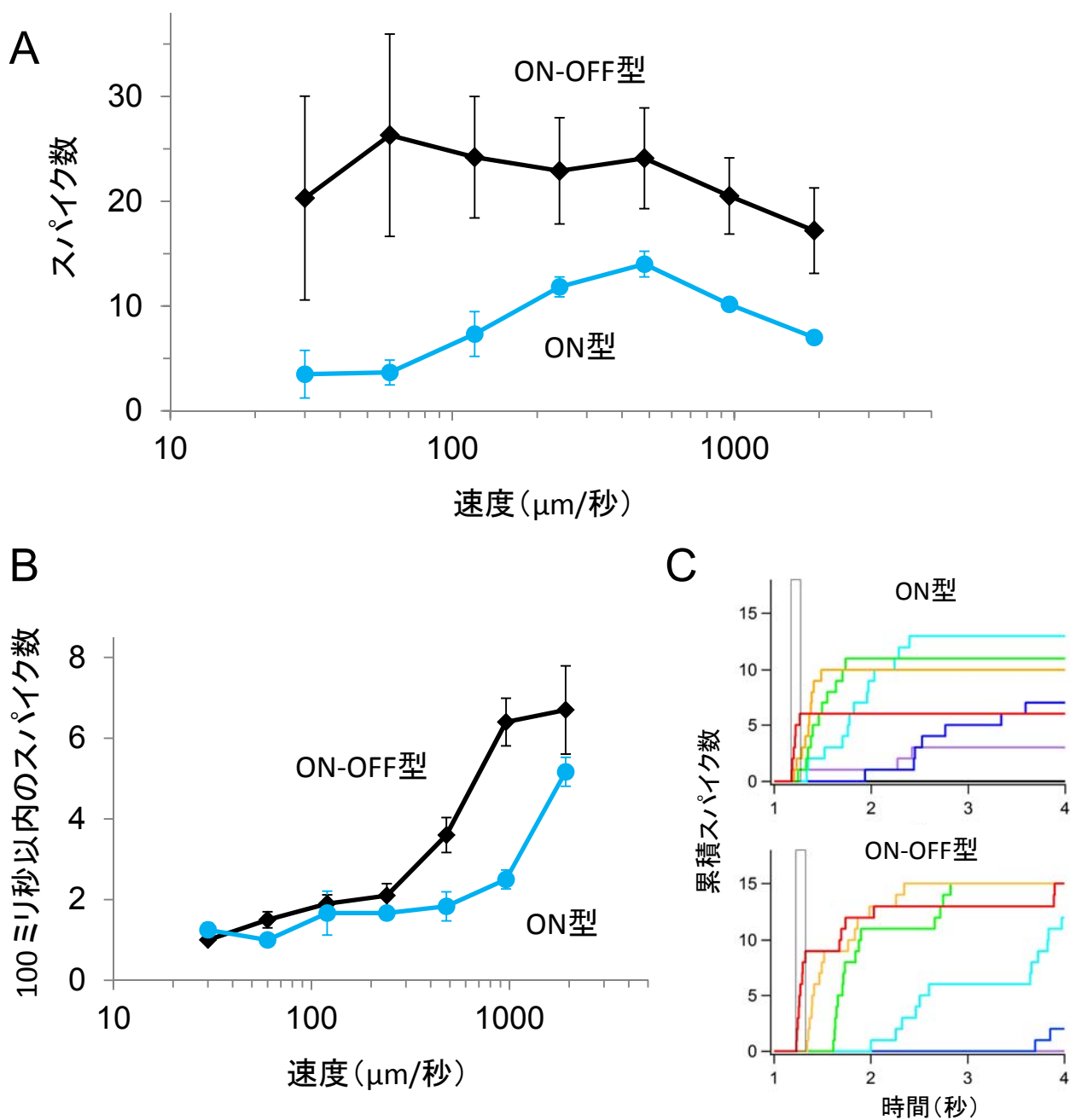


図2.12 バーの運動速度の違いがON型とON-OFF型DSGCに及ぼす影響

A: バーの速度を変化させた時のスパイク数の変化。水色がON型、黒がON-OFF型DSGCのスパイク数を示す。B: バーの速度を変化させた時の、初めのスパイク発火から100ミリ秒以内のスパイク数の変化。C: 図2.10B及び2.11Bの累積スパイク数のグラフの拡大図。四角で囲った部分が1920 $\mu\text{m}/\text{s}$ 条件における初めのスパイクから100ミリ秒の範囲。

が DSGC の受容野内に存在する時間が短くなるので、960 $\mu\text{m}/\text{秒}$ から 1,920 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 条件ではスパイク数が減少してしまう。そこで、どの速度条件でも受容野内に刺激が存在している時間（ここでは、応答開始から 100 ミリ秒とした）で、スパイク数を比較した（図 2.12B, C）。応答初期のスパイク数は速度が上がるにつれて増加し、応答の初期成分によって刺激速度を符号化できることが分かった。

一方、ON-OFF 型 DSGC は ON 型と異なり、30 $\mu\text{m}/\text{秒}$ の遅い刺激にもよく応答した。また、速い刺激にもよく応答し、応答する速度の範囲が広いことが分かった（図 2.11, 2.12A）。ON 型と同様に、累積スパイク数は、刺激の速度が上がるにつれて傾きが大きくなる傾向があった（図 2.11B）。応答初期のスパイク数は、刺激速度が上がるにつれて増加するが、ON 型よりも増加の開始が早く、480 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、960 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 条件でスパイク数が増加し、1,920 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 条件ではやや頭打ちになった（図 2.12B, C）。

以上の結果から、ウサギと異なり、ラットでは ON 型 DSGC が遅い刺激によく応答することはなく、速い刺激にも応答できることが分かった。また、むしろ遅い刺激に対しては ON-OFF 型の方がよく応答し、ON-OFF 型は応答する刺激速度の範囲が広いことが分かった。

3-4 矩形波縞に対する応答

DSGC は眼球運動との関連が示唆されており(Oyster, 1968; Oyster *et al.*, 1972; Yoshida *et al.*, 2001; Dhande *et al.*, 2013)、眼球運動を測定する実験では矩形波縞あるいは正弦波縞が使用される。またウサギを用いて、ON 型、ON-OFF 型 DSGC の刺激速度依存性を検討した Oyster (1968)の実験でも矩形波縞が使用されている。そこで、本実験では、矩形波刺激に対する ON 型、ON-OFF 型 DSGC の応答について検討した。幅 200 μm のバー刺激に対してよく応答したので、400 $\mu\text{m}/\text{cycle}$ の矩形波縞を作成し、ON 型 DSGC がよく応答する 300 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (0.75 Hz) の速度で運動させた。ON 型 DSGC は、矩形波縞が出現した時点で一過性に応答した。ところが、2 秒後に刺激が動き始めてからは不定期にスパイクを発生させることはあるものの、連続して安定してスパイクが出ることはなかった（図 2.13A）(7/8 cells)。膜電位を見てみると、閾値には達していないものの

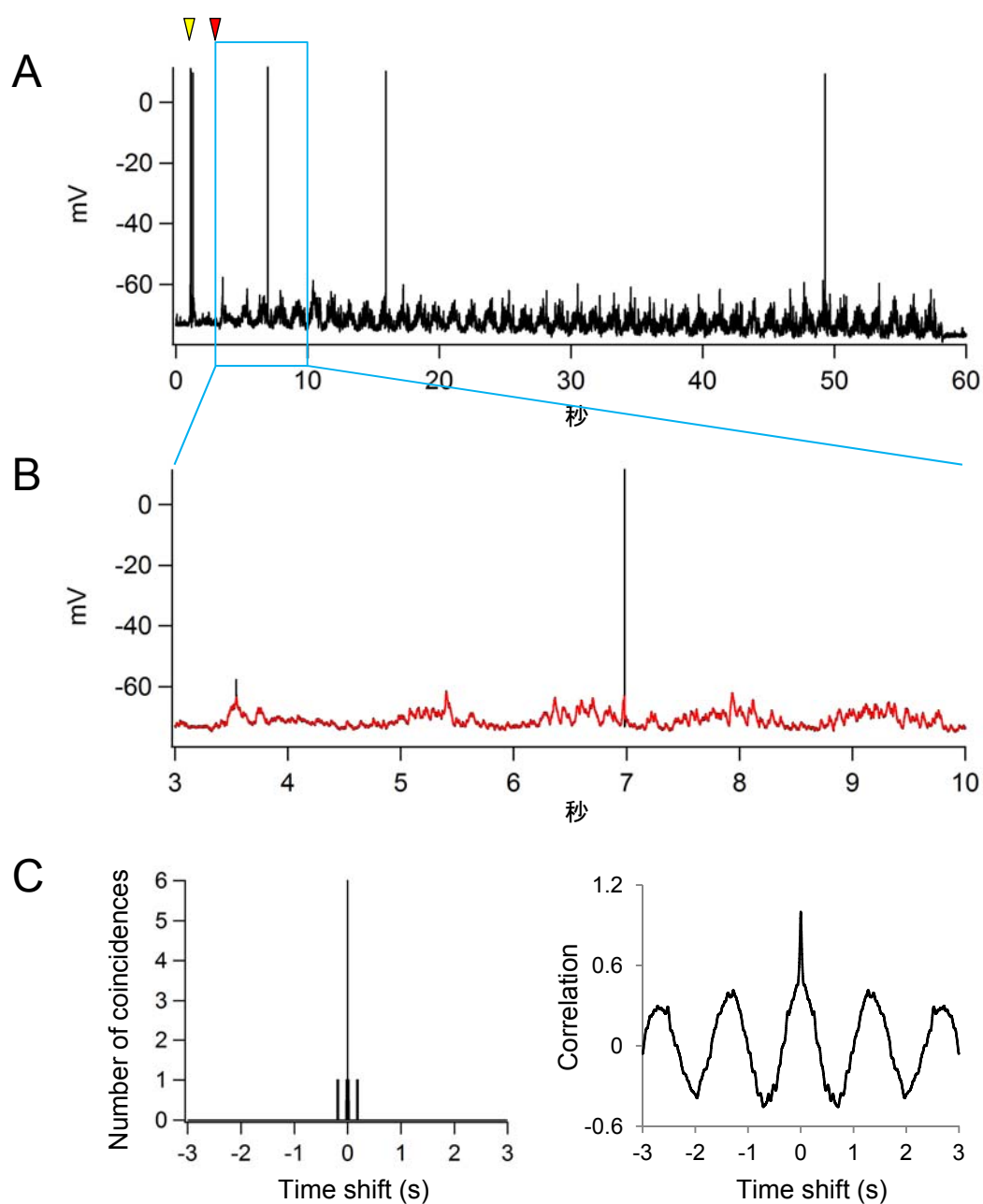


図2.13 矩形波刺激を呈示したときのON型DSGCの応答

A: 400 $\mu\text{m}/\text{cycle}$ 、300 $\mu\text{m}/\text{秒}$ の矩形波を呈示した時のON型DSGCの膜電位変化。黄矢じりは矩形波縞の呈示を、赤矢じりは矩形波縞の運動開始を示す。B: Aの運動開始から7秒間の波形を拡大したもの。赤は、メディアンフィルターをかけてスパイクを除去した波形。C: 左: Aにおけるスパイク発火から算出した自己相関関数(全時間、ビン幅: 10 ms)。右: Bの赤い波形から算出した膜電位の自己相関関数(3-10秒、ビン幅: サンプル間隔)。

周期的に変動していたので、膜電位波形にメディアンフィルターをかけてスパイクを除去し（図 2.13B）、自己相関関数を算出した。すると、 ± 1.3 秒前後にセカンドピークがあり、刺激の 1 周期分の時間と一致した（図 2.13C 右，図 2.15A）。8 細胞分の平均の自己相関関数からパワースペクトルを算出すると、刺激と同じ 0.75 Hz 付近にピークがあり、膜電位は刺激に追従して変動していることが分かった（図 2.15C）。

一方、ON-OFF 型 DSGC は全ての細胞が矩形波縞に対して持続的にスパイクを発生させた（図 2.14A）（5/5 cells）。スパイクについて自己相関関数を算出すると、ON 型と同様に 1.3 秒付近にセカンドピークがあった（図 2.14C 左，2.15F）。ON-OFF 型の細胞は、光のオンセットで ON 応答を、光のオフセットで OFF 応答を示すので、応答の周波数は矩形波縞の周波数の 2 倍になるはずだが、この場合は刺激と同じ周波数だった。これは ON 応答と OFF 応答のどちらかしか生じていないことを意味する。膜電位波形からスパイクを除去し、自己相関関数を算出しても、やはりセカンドピークは 1.3 秒付近にあり、膜電位が刺激の周波数と同じ 0.75 Hz で変動していることが明らかになった（図 2.14C 右，2.15B，2.15D）。

以上の結果から、ON 型 DSGC と ON-OFF 型 DSGC では矩形波縞に対する応答に違いがあることが明らかになった。ON 型は矩形波縞に追従せず、ON-OFF 型は矩形波縞に追従して応答することが分かった。本実験では、記録時間が長くなってしまうため、空間周波数を操作することはほとんどできなかったが、2、3 の ON 型 DSGC については、時間周波数を操作した実験も行った。しかし結果は全て同じであり、どんなに遅い時間周波数でも安定して応答することはなかった。ON-OFF 型については全ての細胞で矩形波縞への追従が見られたが、その周波数が刺激の 2 倍にならなかったことから、空間周波数の設定が細胞にとって最適なものではなかった可能性が示唆された。

4. 考察

4-1 ウサギ網膜 DSGC との相違点

以上の結果から、ラットではウサギの DSGC と様々な違いがあることが分かった。まず運動方向選

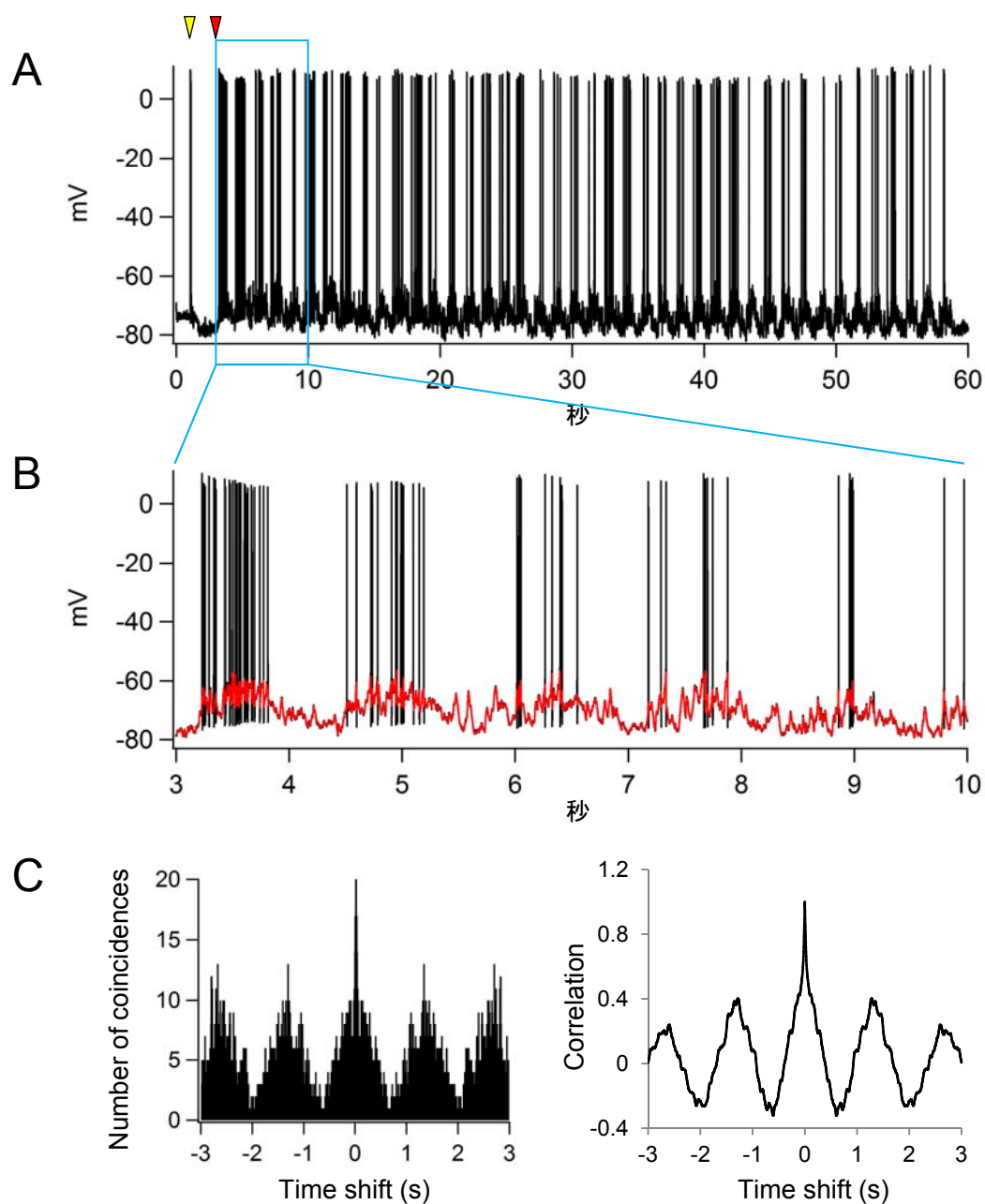


図2.14 矩形波刺激を呈示したときのON-OFF型DSGCの応答

A: 400 $\mu\text{m}/\text{cycle}$ 、300 $\mu\text{m}/\text{秒}$ の矩形波を呈示した時のON-OFF型DSGCの膜電位変化。黄矢じりは矩形波縞の呈示を、赤矢じりは矩形波縞の運動開始を示す。B: Aの運動開始から7秒間の波形を拡大したもの。赤は、メディアンフィルターをかけてスパイクを除去した波形。C: 左: Aにおけるスパイク発火から算出した自己相関関数(全時間、ビン幅: 10 ms)。右: Bの赤い波形から算出した膜電位の自己相関関数(3-10秒、ビン幅: サンプル間隔)。

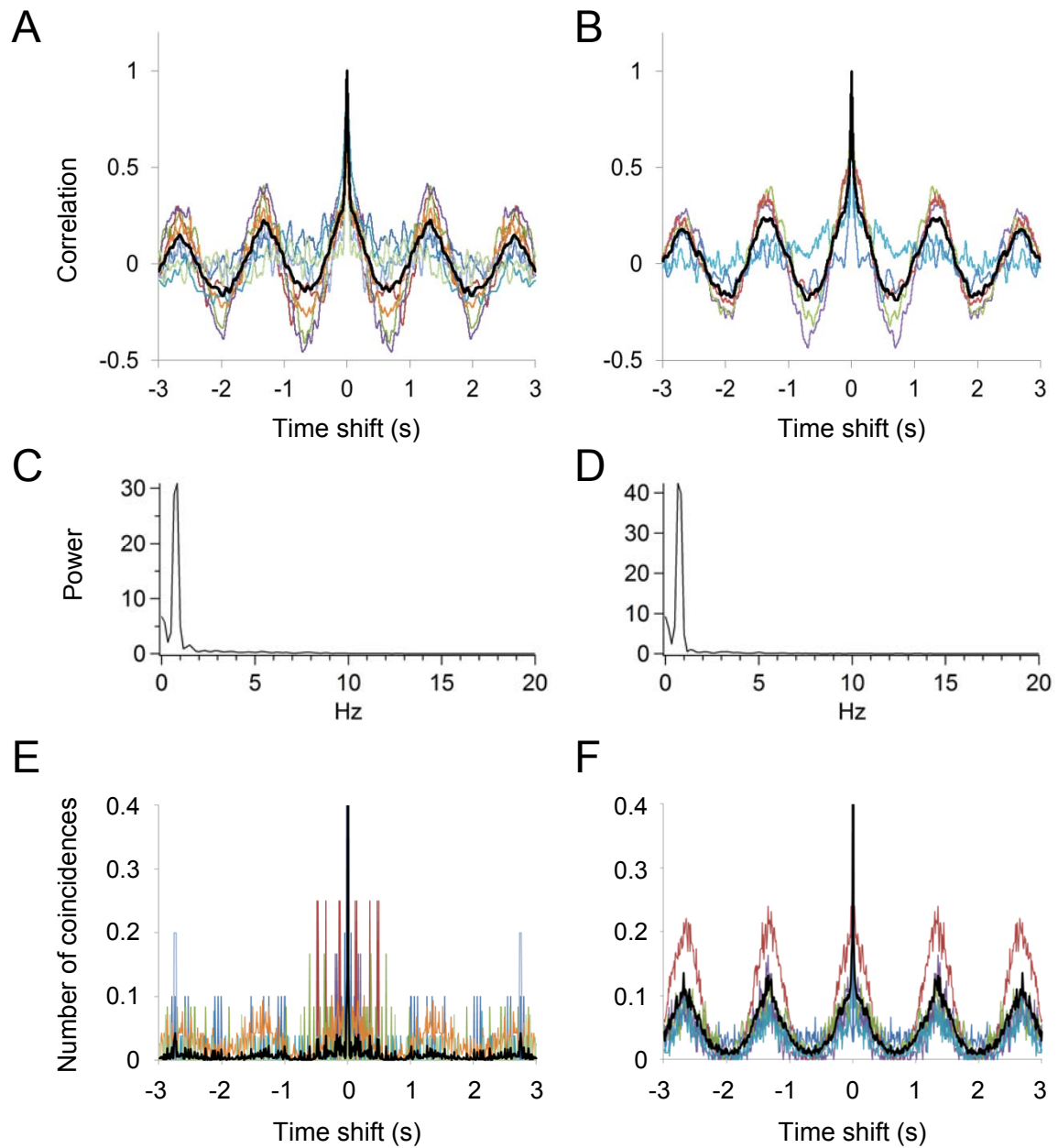


図2.15 矩形波縞を呈示した時のON型DSGCとON-OFF型DSGCの応答

A, C, E: ON型DSGCについての解析 (n = 8 cells)。A: スパイクを除去した膜電位波形から算出した自己相関関数。各色は各細胞の波形、黒は平均を表す。C: Aの平均波形から算出したパワースペクトラム。E: スパイク発火から算出した自己相関関数。B, D, F: ON-OFF型DSGCについての解析 (n = 5 cells)。

択性が生じるために必要な刺激領域であるが、ラットでは ON 型は直径 200 μm (視角約 3.3°) 以上が必要で、ON-OFF 型では 500 μm (約 8.3°) 以上必要だった。ウサギでは、受容野内で $1/4^\circ$ 程度運動刺激を呈示すると、運動方向選択性が観察できる (Barlow & Levick, 1965; Wyatt & Daw, 1975)。したがって、ラットでは ON-OFF 型 DSGC の運動方向選択性の空間解像度がウサギに比べて非常に悪いことが分かった。ON 型に関しては Wyatt & Daw のウサギでのデータが 3 例ほどしかないが、これも、 $1/4^\circ$ 前後の距離にある 2 本のスリット光を連続して呈示することで運動方向選択性がみられるので、やはりラットの方が解像度は悪いことが分かる。そもそも、受容野のサイズが異なることも原因として考えられる。Barlow & Levick が示しているデータによると (一例でしかないが)、ウサギでは、直径 4.5° の受容野内で $1/4^\circ$ の動きを検出できるので、受容野直径のわずか 5.6% の動きで運動方向を検出できることになる。一方、ラットの ON 型 DSGC では受容野直径の平均が約 8° で、 3.3° 以上の動きが必要だったため、受容野直径の 42% の領域で運動刺激を呈示する必要があった。したがって、受容野サイズの違いを考慮しても、ラットでは運動方向選択性の空間解像度が悪いことが明らかになった。

次に速度依存性だが、これについてもウサギと大きく結果が異なった。ウサギでは、ON 型 DSGC は $1^\circ/\text{秒}$ 以下の非常に遅い刺激に対してよく応答するのにに対して、ON-OFF 型は $10^\circ/\text{秒}$ 以上の速い刺激に応答する。これに対して、ラットでは、遅い刺激に対しては ON-OFF 型の方がよく応答し、両タイプとも 1,920 $\mu\text{m}/\text{秒}$ (約 $32^\circ/\text{秒}$) という非常に速い刺激にも十分応答することが明らかになった。

ウサギでは、矩形波刺激に対する応答で速度依存性を計測しているが、ラットによる今回の実験では ON 型 DSGC は矩形波に対して安定した応答を示さなかった。また ON-OFF 型は安定して応答したが、刺激と同じ周波数で応答しており、ON 応答、OFF 応答両方がきちんと矩形波縞に追従したわけではなかった。原因としては空間周波数の設定の問題が考えられる。ウサギでは、約 3° の受容野に対して、矩形波縞の 1 周期を約 5.5° に設定していた。したがってちょうど受容野の大部分を矩形波縞の半周期分が覆う形になっていた。つまり細胞にとっては、白い縞と黒い縞が交互に

受容野に入ってくる刺激であった。ラットでの今回の実験では、ON 型の場合、受容野が約 8° であるのに対して、矩形波縞の 1 周期分を約 6.7° にしてしまったため、受容野内に、約 1.2 周期分の縞が入ってしまっていた。これでは、白い縞が常に受容野内に存在する状態になってしまう。ON-OFF 型の場合は、受容野が小さいので、白い縞と黒い縞は同時に受容野に入っていたが、白い縞（あるいは黒い縞）が常に受容野内に存在することはなかった。したがって刺激と同じ周波数での応答が持続的に出たものと思われる。

4-2 ON 型、ON-OFF 型 DSGC の最適刺激

ON 型 DSGC は遅い運動刺激、ON-OFF 型は速い運動刺激に対してよく応答し (Oyster, 1968; Oyster *et al.*, 1972; Wyatt & Daw, 1975)、ON 型 DSGC は ON-OFF 型よりも樹状突起が広く (Hoshi *et al.*, 2011; Dhande *et al.*, 2013)、ON-OFF 型では周辺抑制が強い (Chiao & Masland, 2003) ことから、ON 型はグローバルな運動情報を、ON-OFF 型は受容野内のローカルな運動情報を担っているという考え方がある (Simpson, 1984; Vaney *et al.*, 2012)。しかし、本実験結果は、この考え方と一致しないものだった。

まず、ラット網膜の ON-OFF 型 DSGC が明確な運動方向選択性を示すのは直径 $500\ \mu\text{m}$ (視角約 8.3°) 以上の領域に刺激が呈示された時であり、刺激領域が直径 $300\ \mu\text{m}$ 以下の場合、スパイク数は最大になるが、運動方向選択性は弱くなった。Chiao & Masland (2003) のウサギを用いた実験でも刺激面積を変化させているが、選好方向に矩形波縞を動かしたときのスパイク数だけを指標としたため、刺激面積によって運動方向選択性が変化することには気づかなかったのだろう。したがって、ON-OFF 型 DSGC が担うのは、むしろグローバルな運動情報だと思われる。ウサギでは、同じ運動方向選択性を持つ ON-OFF 型 DSGC がギャップ結合でつながっているという報告がある (Vaney, 1994; Amthor & Oyster, 1995)。ON-OFF 型 DSGC は刺激領域が大きくなると、スパイク数が減少してしまうという問題点があるが、同じ運動方向選択性をもつ周辺の細胞とギャップ結合でつながっていれば、入力を増やし、かつ運動方向選択性を維持することができる。したがって、

Oyster ら(1972)らがいうように、ON-OFF 型 DSGC は視野全体の動きに対して眼球を追従させるのに役立っているのではないだろうか。

これに対して、ON 型 DSGC は直径 200 μm (視角約 3.3°) 以上の刺激領域があれば、運動方向選択性を維持することができた。したがって ON 型は刺激領域の大小に関わらず、運動方向を符号化することができる。ON 型 DSGC は前庭動眼反射や視運動性反応との関わりが示唆されている (Simpson, 1984; Ito, 2013)。前庭動眼反射とは、身体が動いた時に、それとは逆方向に眼球を動かして網膜像のぶれを防ぐ反射であるが、この反射がうまくいわずに網膜像がずれた時、それを ON 型 DSGC が脳に伝達すると推定されている。前庭動眼反射の経路に関与する小脳のプルキンエ細胞は、広い受容野を持ち、全視野のランダムドットパターンの動きに対して、特定の軸 (垂直、前方 45° 、後方 135° の軸のうち、どれか) の運動に選択性をもって応答する (Graf *et al.*, 1988)。ON 型 DSGC が受容野内の一部の運動に対しても高い運動方向選択性を示すということは、そのシグナルが高次の細胞において収斂されたとき、全視野に広がったドットパターンの1ドットが ON 型 DSGC の受容野サイズより小さくても、ドットが ON 型 DSGC の受容野より小さいわずかな領域を移動するだけであっても、高次の細胞はそのドットパターンの動きに選択性をもって反応できるということとなる。したがって、誤差信号を送るという役割には適しているといえるのかもしれない。

第3章 逆行性越シナプストレーサーを用いたアマクリン細胞の検討

1. 目的

ON-OFF 型 DSGC は、starburst amacrine cell (SAC) から選好方向と非選好方向で非対称な抑制性の入力を受け取ることで、運動方向選択性を形成していると考えられている。では、ON 型 DSGC はどのようなメカニズムで運動方向選択性を形成しているのだろうか。第2章では ON 型と ON-OFF 型 DSGC の性質の違いが明らかになったが、やはり ON-OFF 型と同様に SAC から非対称な入力を受け取っているのだろうか。このことを明らかにするため、本章では ON 型 DSGC に入力を送っているアマクリン細胞を同定することを目的とした。

近年、逆行性に（すなわち神経細胞の軸索末端から細胞体の方向に）シナプスを越えて神経細胞をラベルすることができるトレーサー（逆行性越シナプス性トレーサー）として、狂犬病ウイルスが注目され（Ugolini, 1995; Kelly & Strick, 2000）、脳の複雑な神経連絡を解明するために脳の様々な部位で使用されている（Miyachi *et al.*, 2005; Ninomiya *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012; Hirata *et al.*, 2013; Miyachi *et al.*, 2013）。越シナプス性トレーサーとしてこれまでに使われてきた単純ヘルペスウイルス I 型や豚ヘルペスウイルスには、感染細胞の変性や脱落を引き起こしたり、シナプス結合していない近傍の細胞にウイルスが拡散したりするという問題があった（Strack *et al.*, 1989; Ugolini, 1992）。しかし、狂犬病ウイルスは、細胞へのダメージが極めて少なく、シナプス結合していない細胞や周囲を通過している神経線維にウイルスが感染したという事例は今のところ報告されていない。

本章の目的は、ON 型 DSGC に入力しているアマクリン細胞のサブタイプを、逆行性越シナプス性トレーサーを用いて解剖学的に明らかにすることである。

2. 方法

2-1 動物

被験体としてラット(成体、～300 g、Long Evans および Wistar 系)を用いた。本実験では ON 型 DSGC とシナプス結合している抑制性アマクリン細胞の同定が目的であるため、あらかじめ GABA を放出するニューロン(GABA 作動性ニューロン)が Venus という蛍光タンパク質で標識された遺伝子改変動物も使用した(VGAT-Venus rat)。これは、抑制性神経伝達物質である GABA をシナプス小胞に充填するトランスポーター(vesicular GABA transporter:VGAT)の遺伝子領域に Venus 遺伝子を挿入したコンストラクトを大腸菌内での相同組換えを利用して作製し、それをラット(Wistar 系)の受精卵に導入して作製したものである(Uematsu *et al.*, 2008)。GABA 作動性の細胞は必ず VGAT を発現しているので、これによって GABA 作動性のアマクリン細胞を可視化することができる。本実験計画は、東京都神経科学総合研究所(現、東京都医学総合研究所)の動物実験倫理委員会により承認されており、全ての実験は、同研究所の動物実験指針ならびに「動物の愛護及び管理に関する法律」をはじめとする関係法令を遵守して行われた。また、狂犬病ウイルスの取り扱いについては感染症法および家畜伝染予防法に基づく申請が承認されている。動物への狂犬病ウイルス(三種病原体)の接種、感染動物の飼育、灌流固定等は、研究所のバイオセーフティ委員会が定める研究用微生物等安全管理規程に従い、所内に設置されている P2A レベルの霊長類専用感染実験室において行われた。

2-2 ウイルス

逆行性越シナプス性トレーサーとして、狂犬病ウイルスを用いた(Ugolini, 1995; Kelly & Strick, 2000)。狂犬病ウイルスは神経組織に親和性が強く、咬傷部位から侵入した後末梢の神経組織を介して求心的に中枢神経に達する。ウイルスは神経細胞に感染すると、逆行性の軸索輸送によって細胞体に運ばれる。細胞質でゲノム RNA から必要なタンパクを合成し、ゲノム RNA を複製し、最終的には宿主の細胞膜からエンベロープを獲得して細胞外に出ていく(出芽)。そしてシ

ナプスを越えて、神経連絡を有するシナプス前細胞の軸索末端に感染する。

今回用いた狂犬病ウイルス(challenge-virus-standard (CVS-11) strain)は、米国疾病予防管理センター由来の株を、国立感染症研究所の井上智博士が継体したもので、ウイルス懸濁液の力価は 1.4×10^8 focus-forming units/mL であった。この株は、Ugolini や、Kelly & Strick が用いているものと同じ株であり、逆行性に軸索輸送されることが確認されている(Ugolini, 1995; Kelly & Strick, 2000)。また、時間依存的にシナプスを越えて感染するので、ウイルスを注入してから時間を調節することにより、ウイルスが越えるシナプス数がある程度限定することができる。サルでは、48 時間以内に、ウイルスが注入部位から細胞体に運ばれて増殖し 1 次感染ニューロンがラベルされ、その後 24 時間ごとに、逆行性にシナプスを越えて次のニューロンがラベルされる(Kelly & Strick, 2000)。ラットの舌下神経にウイルスを注入した実験でも、感染から 2.5 日で 2 次感染ニューロンがラベルされ始め、3 日目にはさらに多くの 2 次感染ニューロンがラベルされる(Ugolini, 1995)。そこで本実験では、ON 型 DSGC の投射先である神経核 medial terminal nucleus (MTN)に狂犬病ウイルスを注入し、ON 型 DSGC (1 次感染ニューロン)に inputs するアマクリン細胞 (2 次感染ニューロン)をラベルするために、注入後、観察までの時間を 2.5 日から 3 日間とした。

2-3 ウイルスの脳への注入

ラットを麻酔するため、ケタラール®(ケタミン:50 mg/mL, 第一三共プロファーマ)を体重 1 kg あたり 1 mL を後肢の筋肉に注入した (50 mg/kg)。続いてセラクタール®(キシラジン:20 mg/mL, バイエル メディカル)を体重 1 kg あたり 0.5 mL 反対側の後肢の筋肉に注入した (10 mg/kg)。あるいは、ペントバルビタールナトリウム(東京化成工業)を超純水で 5% (0.5 g/10 mL) に希釈したものを、体重 1 kg あたり 1 mL を腹腔内へ注入した (50 mg/kg)。麻酔が効いたことを確かめた後、頭部の毛をバリカンで刈り、脳定位固定装置 (SR-6N, NARISHIGE) にラットを固定した。頭蓋骨を露出させ、bregma を基準として、MTN の上部にあたる位置 (座標: ML 1.3 mm, AP - 5.4 mm) の頭蓋骨に歯科用ドリルで小さな穴をあけた。脳表から 7.8 mm の深さの部位にウイルスを微

量注入した。ウイルスの注入にはハミルトンシリンジ(#80001, 10 μ L, Model 1701 LT, Hamilton)と注射針(#90130, 30 gauge, 2 in, point style 2, Hamilton)を用いた。ウイルスは、0.2 μ L ずつ30 秒かけて注入し、合計 1 μ L 注入した。注入終了後より 10 分経過してから、注射針をゆっくりと脳から引き抜いた。頭皮はクリップで縫合した。

2-4 灌流固定

脳及び網膜の組織学的解析を行うために、ホルマリン溶液による経心的な灌流固定を実施した。ウイルスが ON 型 DSGC の細胞体内で増殖し、出芽し、DSGC のシナプス前細胞に感染するまで 2.5 日から 3 日間待った後に、体循環を介して固定液を全身的に行き渡らせ、動物の全組織をホルマリン固定した。動物はウイルスに感染しているので、安全のためケージごとビニール袋に入れ、エーテルで十分に麻酔した後、ケージから取出し、過量のペントバルビタールを腹腔内に注入した。胸部切開により心臓を露出させ、血液を排出する目的で右心耳を切開し、固定液を注入するため素早く左心室に注射針を挿入して先端を上行大動脈内に位置させた。まず、血液を洗い流すために、0.1 M リン酸緩衝食塩水(PBS) (表 3.3) で灌流し、続いて固定液で灌流した。固定液は、飽和ピクリン酸(表 3.4) 15%, ホルマリン(37% ホルムアルデヒド液 #064-00406, 和光純薬工業) 10%を 0.1 M リン酸緩衝液(PB) (表 3.2)に混ぜたもの(pH 7.4)を用いた。固定後、脳と眼球を摘出し、さらに固定液に一晩浸けた。

2-5 薄切

神経組織を免疫染色して顕微鏡下で観察するために、脳および眼球を凍結して薄切した。組織を凍結する際に、組織に水が残っていると、水は凍ると膨張するため、組織を壊してしまう。そこで、一晩固定した後は、組織を 30% sucrose 溶液(表 3.5)に移し替え、組織内に浸透した固定液を組織外へ排出した。また、30% sucrose が組織に浸透することで、凍結した際に適度な硬度になり、薄切が容易になるという利点もあった。脳は、30% sucrose 溶液に浸けて一週間ほど待ち、脳が sucrose

表3.1

0.2 M リン酸緩衝液 (phosphate buffer : PB)	分子量	2 L
リン酸水素ナトリウム二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	156.01	77.11 g
水酸化ナトリウム (NaOH)	40.00	15.6 g
		in 超純水
緩衝液とは、pHをある程度一定に保つための溶液で、弱酸とその共役塩基や弱塩基とその共役酸を混合したものである。pH 7.4.		

表3.2

0.1 M リン酸緩衝液 (phosphate buffer : PB)	分子量	2 L
0.2 M PB		1 L
		in 超純水
pH 7.4		

表3.3

0.1 M リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffer saline : PBS)	分子量	2 L
0.2 M PB		1 L
塩化ナトリウム (NaCl)	58.44	18 g
		in 超純水

表3.4

飽和ピクリン酸	分子量	1.1 L
ピクリン酸 (2,4,6-Trinitrophenol)	229.10	50 g
		in 超純水
熱して(80度以下)溶解させる。常温に戻すと針状結晶が生じる(飽和している)。この状態で暗所に保管する。使用時に、上澄み液をろ過して使用する。ホルマリンがタンパク、ペプチド鎖に対する架橋形成による固定であるのに対して、ピクリン酸はタンパク質を凝固沈殿させて固定する。固定の速度はより速やかだといわれている。		

表3.5

30% sucrose溶液	分子量	
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	342.3	30 %
アジ化ナトリウム (NaN ₃)	65.01	0.02%
		in 0.1 M PB

表3.6

1% スキムミルク	
スキムミルク	1%
	in PBS

表3.7

1次抗体液	
ウサギ抗狂犬病抗体	1:10,000
Normal Goat Serum (NGS)	2%
Triton X-100	0.1%
アジ化ナトリウム (NaN ₃)	0.02%
	in PBS

表3.8

2次抗体液	
ビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG抗体	1:200
Normal Goat Serum (NGS)	1%
	In PBS

表3.9

ABC液	
ABC kit A液	1:200
ABC kit B液	1:200
	in PBS

溶液に沈んだのを確認してからマイクローム(リトラーム REM-700(本体), MC-802A エレクトロリリース(ステージ冷却装置), CLS 300(冷却循環装置), YAMATO)で厚さ 40 μm に薄切した。スライス切片は一度 PBS で洗浄してから、アジ化ナトリウムを添加した PBS 内で保存した。

マイクロームでは、ステージの温度を -30°C にして、その上で組織を凍結させて薄切する。しかし、マイクロームの刃は冷えていないため、組織は切った瞬間に溶けてしまう。眼球の場合は、網膜が非常に柔らかい組織であるため、切った瞬間に網膜が強膜と分離して、筆で組織を拾うときに伸びたり捻じれたりしてしまう。そこで、眼球の薄切にはクライオスタット(CM3000, Leica)を用いた。この場合は、 -20°C のチャンバー内で組織を薄切するため、切った後も組織が凍ったままであり、そのままスライドに張り付けることができる。まず、眼球をブロック状に凍結包埋した。レンズは粘性があつてうまく切れないため、角膜とレンズを切り取り、そこから眼球内に凍結包埋剤(4% CMC, Carboxymethyl cellulose sodium salt in DW, 製造 Section-lab, 販売 Leica Microsystems)を流し込んだ。アルミホイルで立方体の箱を作り、その中に包埋剤を流し込んで、眼球を入れ、上からまた包埋剤を流し込んだ。ビーカーに入れたヘキサン(Hexane)にドライアイスを一かけらずつ加えてヘキサンの温度を下げ、温度が -40°C より低くなったところで試料を入れて、凍結させた。

次に、この凍結させたブロックをクライオスタットのステージ上に固定した。まず凍結包埋剤(O.C.T. compound, 4583, サクラファインテック)をステージ上に塗って、濾紙(No.4A, 東洋濾紙)を張り付け、砕いたドライアイスにステージを差し込んで冷やし固めた。その上にまた包埋剤を塗って先ほどのブロックを張り付け、さらにブロックの周りを包埋剤で補強した。このステージをクライオスタットのチャンバー内に取り付け、眼球を 20 μm に薄切した。薄切した切片は、スライドガラス(スーパーフロスト グリーン APS, S8445, 松浪硝子工業)に張り付けた。

2-6 脳の染色

薄切した脳切片は 6 枚ごとに取り、狂犬病ウイルスの抗体(Inoue *et al.*, 2003)で免疫染色を行った。標準的な ABC(avidin-biotinylated peroxidase complex)法を用いて染色した。これは、

抗原抗体反応と、アビジン・ビオチン反応を組み合わせる手法である(図 3.1)。発色の原理は、過酸化水素 (H_2O_2) を基質とするペルオキシダーゼ(過酸化酵素, HRP, horseradish peroxidase)が H_2O_2 による DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) の酸化を触媒することで、大量の発色物質が生成されることによる。

まず、内因性のペルオキシダーゼ活性を阻止するために、脳切片を 0.3% H_2O_2 を加えた PBS に浸し 30 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、抗体と組織・細胞中のタンパクの非特異的反応を防ぐために、1% スキムミルク(表 3.6) で 1 時間ブロッキングした。続いて、脳切片を 1 次抗体液(表 3.7) に浸し、一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、2 次抗体液(表 3.8) で 2 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄し、あらかじめ用意しておいた ABC 液(表 3.9) で 90 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄して、DAB 液(表 3.10) に浸し、 H_2O_2 を 0.002% 程度加えて発色させた。適度に発色してきたところで、速やかに切片を PBS へ移し、反応を停止させた。

脳切片は PBS 中で吻側から尾側へ順番に並べ、乾かした際に結晶ができるのを防ぐため、0.01M PB (0.1M PB を 10 倍希釈したもの) に一端浸してから、ゼラチンコートしたスライドガラスに張り付けた。最後に、背景の組織構造を識別しやすいように、0.5% Neutral Red で対比染色を行い、アルコールによる脱水、キシレンによるアルコール除去と透徹を経て(※)、標本用封入剤 (NEW M・X, 粘度 (mPa・s) 590, 屈折率 1.545, 松浪硝子工業) で封入した。一般的な樹脂系の封入剤はキシレンに親和性があり、水やアルコールと混ざり合わないため、この作業が必要となる。

(※) 核染色、脱水、透徹: 超純水 (3 秒) → Neutral Red (30 秒) → 超純水 (10 秒) → 1% 酢酸水 (5 秒) → 2% 酢酸水 (5 秒) → 超純水 (10 秒) → 70% アルコール (30 秒) → 90% アルコール (30 秒) → 100% アルコール (20 秒) → 100% アルコール (40 秒) → アルコール: キシレン = 1:1 (1 分) → キシレン (1 分以内) → キシレン (5 分以上) → キシレン (5 分以上)

表3.10

DAB液	
DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride)	10 mg (1粒)
塩化ニッケル (II) (NiCl_2)	0.04%
	in 0.05M トリス緩衝液

表3.11

0.05 M トリス緩衝液	分子量	
Trizma® base (Sigma-Aldrich) ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)	121.14	1.39 g
Trizma® HCl (Sigma-Aldrich) ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$)	157.60	6.06 g
		in 超純水
pH 7.6		

表3.12

1次抗体液	
ウサギ抗狂犬病抗体	1:5,000
マウス抗GFP抗体	1:500
ヤギ抗choline acetyltransferase抗体	1:200
Triton X-100	0.1%
アジ化ナトリウム (NaN_3)	0.02%
	in PBS

表3.13

2次抗体液	
Alexa Fluor® 488/555/647* ロバ抗ウサギIgG抗体	1:200
Alexa Fluor® 488/555/647* ロバ抗マウスIgG抗体	1:200
Alexa Fluor® 488/555/647* ロバ抗ヤギIgG抗体	1:200
*この3種類のうちいずれか	in PBS

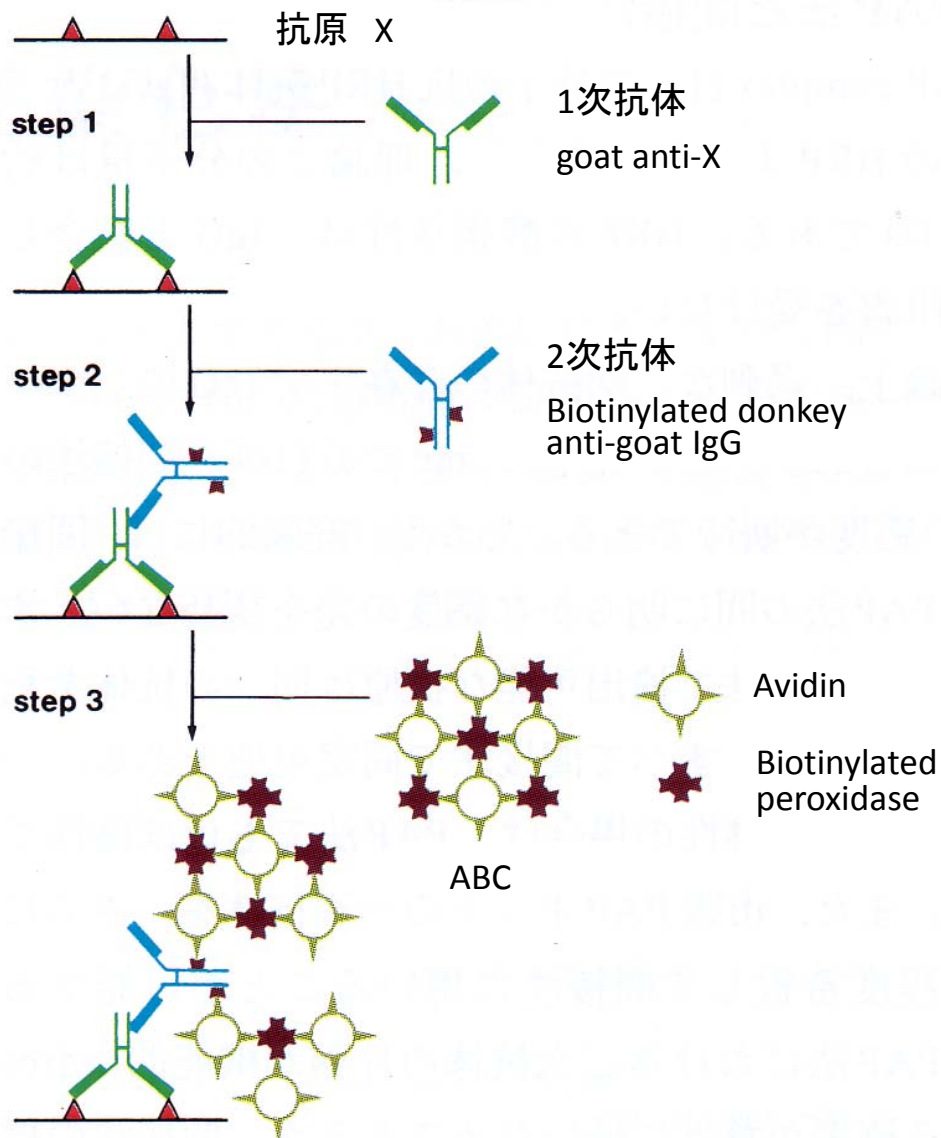


図3.1 ABC法(avidin-biotinylated peroxidase complex method)の原理図(「渡辺・中根 酵素抗体法」より改変)

アビジンは卵白中に存在するタンパク質で、ビタミンの一種であるビオチンに非常に高い親和性を持つ(抗原抗体反応の100万倍以上の親和力)。アビジンには4つのビオチン結合部位がある。アビジンとビオチン化されたperoxidaseを結合させたもの(ABC)をビオチン化された2次抗体に反応させることで感度を増幅する。Step 1: 抗原Xに対する1次抗体を反応させる。Step 2: 1次抗体に結合するビオチン化された2次抗体を反応させる。Step 3: 2次抗体にABCを反応させる。

2-7 網膜の染色

眼球のスライス切片は、ドライヤーで完全に乾燥させた後、脳と同じ手順で ABC 法により狂犬病ウイルスに感染した細胞を染色した。脳切片の場合は、通常ウェルに反応液や洗浄用の PBS 入れ、脳切片を移動させるが、眼球切片の場合は、薄切時にスライドガラスに張り付けているため、その状態で染色作業を行わなければならない。スライドガラスごと入るような容器に十分な抗体液を作成するのはコストがかかるため、スライドの切片周辺にだけ反応液が行き渡るようにした。まず、プラスチック製の蓋つきの容器を用意し、反応液が乾燥しないように、薄く超純水を容器に満たした。水に浸からないように台(使わなくなったウェルなど)を置いて、水平になるようにガラス板を置いた。ガラス板の上に、細く切ったパラフィルムを 2 列貼り付け、そこに切片側が下になるようにスライドガラスを置いた。基本的にこのガラス板とスライドガラスの間にピペットで液を流し込んで反応を行った。最後の DAB 反応だけは、発色の具合を見ながら異なる H_2O_2 濃度の液を加えていく必要があるため、スライドを切片が上になるように置いて行った。PBS による洗浄は、染色バットを用いて行った。

狂犬病ウイルスに感染した細胞の種類を同定するために、蛍光色素を使った多重染色も行った。狂犬病ウイルスに感染している細胞は上述の抗狂犬病抗体(Inoue *et al.*, 2003)を用いて染色した。また、遺伝子改変ラットを用いた場合、GABA 作動性ニューロンには、Venus という蛍光タンパクが発現している。Venus はそのままでも観察可能だが、さらに蛍光を増強するため、抗 GFP (Green fluorescent protein) 抗体を用いて染色した (Venus は GFP の数個のアミノ酸を置換して改良された蛍光タンパクなので、抗 GFP 抗体を用いることが可能)。また、ON-OFF 型 DSGC の運動方向選択性の形成に関与するのではないかと考えられている starburst amacrine cell (SAC) は、GABA を放出するのみならず、網膜内で唯一アセチルコリンを放出する細胞なので、アセチルコリンの合成酵素である choline acetyltransferase (ChAT) に対する抗体を用いて染色した。

具体的なプロトコルとしては、1 時間 1% スキムミルク (表 3.6) でブロッキングした後、1 次抗体液 (表 3.12) に一晩浸けて反応させた。3 回 PBS で洗浄した後、2 次抗体液 (表 3.13) で 2 時間反応させて、PBS で 3 回洗浄した。最後に乾燥させて、蛍光色素用の封入剤 (#P-7481, ProLong®

Antifade Kit, Thermo Fisher Scientific) で封入した。

3. 結果

3-1 狂犬病ウイルスの注入部位

逆行性越シナプス性トレーサーである狂犬病ウイルスを網膜 ON 型 DSGC の投射先である MTN に注入した。ウイルスの注入部位を確認するために、注入を行った全てのラットの脳はマイクロームで 40 μm に薄切し、ウイルスに対する抗体で免疫染色を行った(図 3.2)。MTN は幅 100 μm 、長さ 1 mm 程のごく小さな神経核であり、ウイルスを正確に注入することはかなり困難であった。MTN にウイルスが注入されていることが確認できたラットについてのみ、網膜におけるニューロンラベルの解析を行った。

3-2 網膜における狂犬病ウイルス陽性ニューロン

図 3.3 は、狂犬病ウイルスを注入してから 3 日後に灌流固定したラットの網膜の薄切標本である。狂犬病ウイルスの抗体で染色すると、神経節細胞層に大きさや濃淡の異なるウイルス陽性(+)細胞が確認出来る。アマクリン細胞層にも薄く染まったウイルス(+)細胞が見える。感染から長く時間が経過している方が細胞内で十分にウイルスが増殖しているために、濃くラベルされる。したがって、神経節細胞層で濃く染まっている細胞(図 3.3、黒矢じり)が 1 次感染ニューロンの ON 型 DSGC であると思われる。MTN 投射ニューロンはしばしば 2 つの細胞が隣接して存在する(Dann & Buhl, 1987; Yonehara *et al.*, 2008)。図 3.3 も 2 細胞が隣接しており、樹状突起も内網状層の ON 層にあることから、MTN に投射する ON 型 DSGC であると推定できる。神経節細胞層にはもう一種類、やや小さくて薄く染まっている細胞が見られる(図 3.3、矢印)。これらは染まり方から 2 次感染ニューロンであると思われる。これらの細胞は、神経節細胞層に存在することから、神経節細胞か異所性アマクリン細胞であると考えられる。しかし、神経節細胞から神経節細胞へのシナプス入力はないことから、次のような可能性が考えられる。第 1 の可能性は、MTN に投射する核(DTN, LTN, NOT,

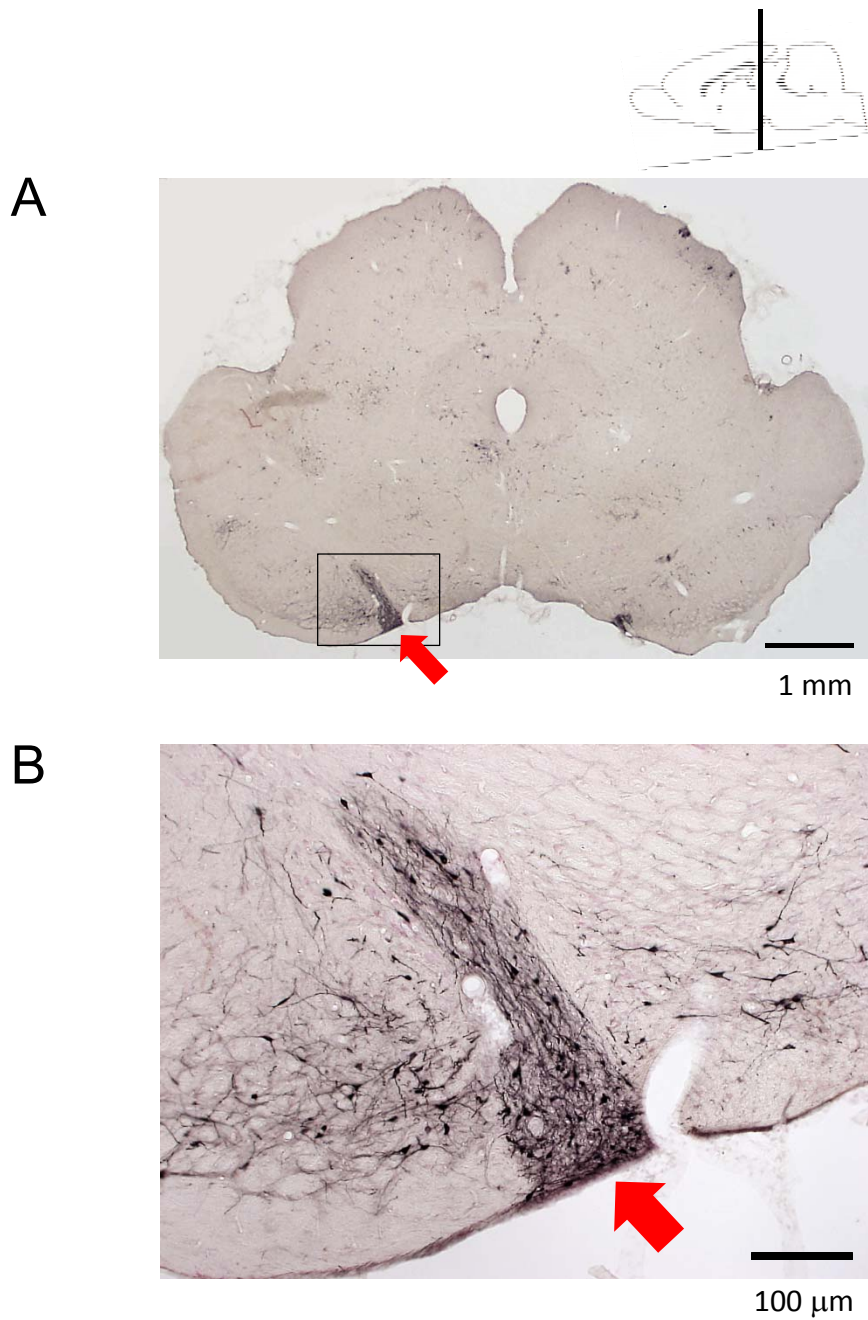


図3.2 狂犬病ウイルスを注入したラットの脳

狂犬病ウイルスをMTN(赤矢印)付近に注入し、3日後に灌流固定した。厚さ40 μmに薄切し、ウイルスに対する抗体で免疫染色した。黒く染まっている部分が、ウイルスに感染したニューロン群。MTNのニューロン群がウイルスでラベルされていることが分かる。

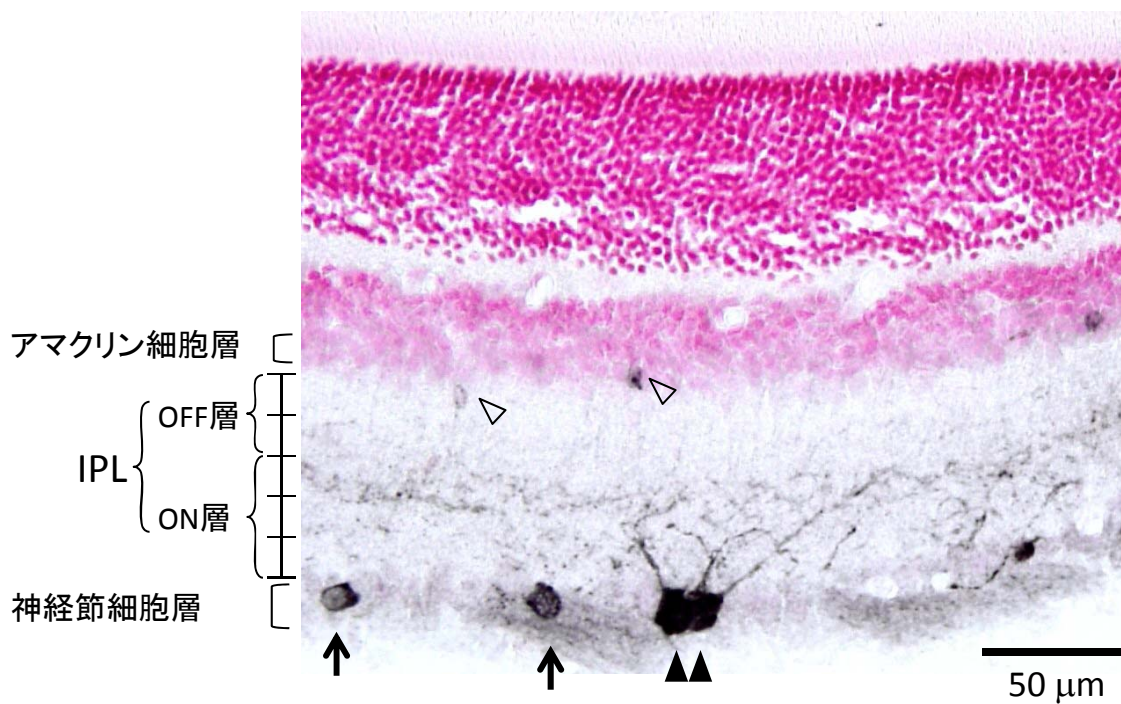


図3.3 狂犬病ウイルスでラベルされたラット網膜のニューロン

ラット脳のMTNにウイルスを注入し、3日後、網膜を薄切し、狂犬病のウイルスに対する抗体で免疫染色した。ON型DSGCと思われる神経節細胞(黒矢じり)は、IPLのON層に樹状突起を伸ばしている。神経節細胞層には、ほかにもやや小さい細胞体がウイルスでラベルされている(矢印)。また、アマクリン細胞層にも、非常に薄くラベルされたアマクリン細胞が見られる(白矢じり)。IPL: inner plexiform layer, 内網状層。

vLGN)のニューロンのシナプス前細胞、つまりこれらの核に投射する神経節細胞である可能性である(図 3.4)。MTNには網膜からの入力以外にも、DTN, LTN, NOT, vLGN からも入力がある。これらの神経核には網膜からの入力があることから、2 次感染ニューロンとしてこれらの核に投射する神経節細胞がラベルされる。第 2 の可能性は、ON 型 DSGC に入力する異所性アマクリン細胞という可能性である。これまで、ON-OFF 型 DSGC では starburst amacrine cell (SAC) が運動方向選択性に関与するといわれてきた。SAC にも異所性アマクリン細胞が存在することから、これらの細胞も、SAC である可能性がある。そこで、以下に述べる多重染色の実験で、この可能性について検証した。図 3.3 ではアマクリン細胞層にもさらに薄くラベルされた小さな細胞が見られる(白矢じり)。これらは、2 次感染ニューロンか、3 次感染ニューロンか定かではないので、以下の実験では観察までの時間をさらに短くし、ウイルス注入後 2.5 日目に組織を固定して観察を行った。

3-3 多重染色による 2 次感染ニューロンの同定

狂犬病ウイルスを注入してから 2.5 日後に灌流固定をし、薄切した網膜を多重染色した(図 3.5)。狂犬病ウイルスに感染している細胞は、主に神経節細胞層に見られた(図 3.5A)。濃くラベルされているものが 1 次感染ニューロンで、薄くラベルされているやや小さい細胞が 2 次感染ニューロンだと思われる。濃くラベルされている方は、Venus を発現していないので、神経節細胞であることが分かる(図 3.5C、矢じり)。一方、薄くラベルされている方は、Venus を発現している(図 3.5C、太矢印)ので、GABA 作動性のアマクリン細胞である。問題は、この細胞が SAC かどうかということだが、SAC は網膜内で唯一アセチルコリンを放出する細胞であると同時に、GABA も放出する細胞である(O'Malley & Masland, 1989)。したがって SAC は Venus(+)かつ ChAT(+)となる(実際、図 3.5B で ChAT(+)となっている細胞(細矢印)は、薄くではあるが、Venus(+)であることが分かる(図 3.5C、細矢印))。したがって、Venus(+)であっても、SAC かどうかはわからないのだが、狂犬病ウイルスの抗体で薄く染まった細胞は ChAT(-)なので、SAC 以外のアマクリン細胞であることが明らかになった(図 3.5B、太矢印)。つまり、ON-OFF 型 DSGC に対して、直接抑制性の入力を送ることで

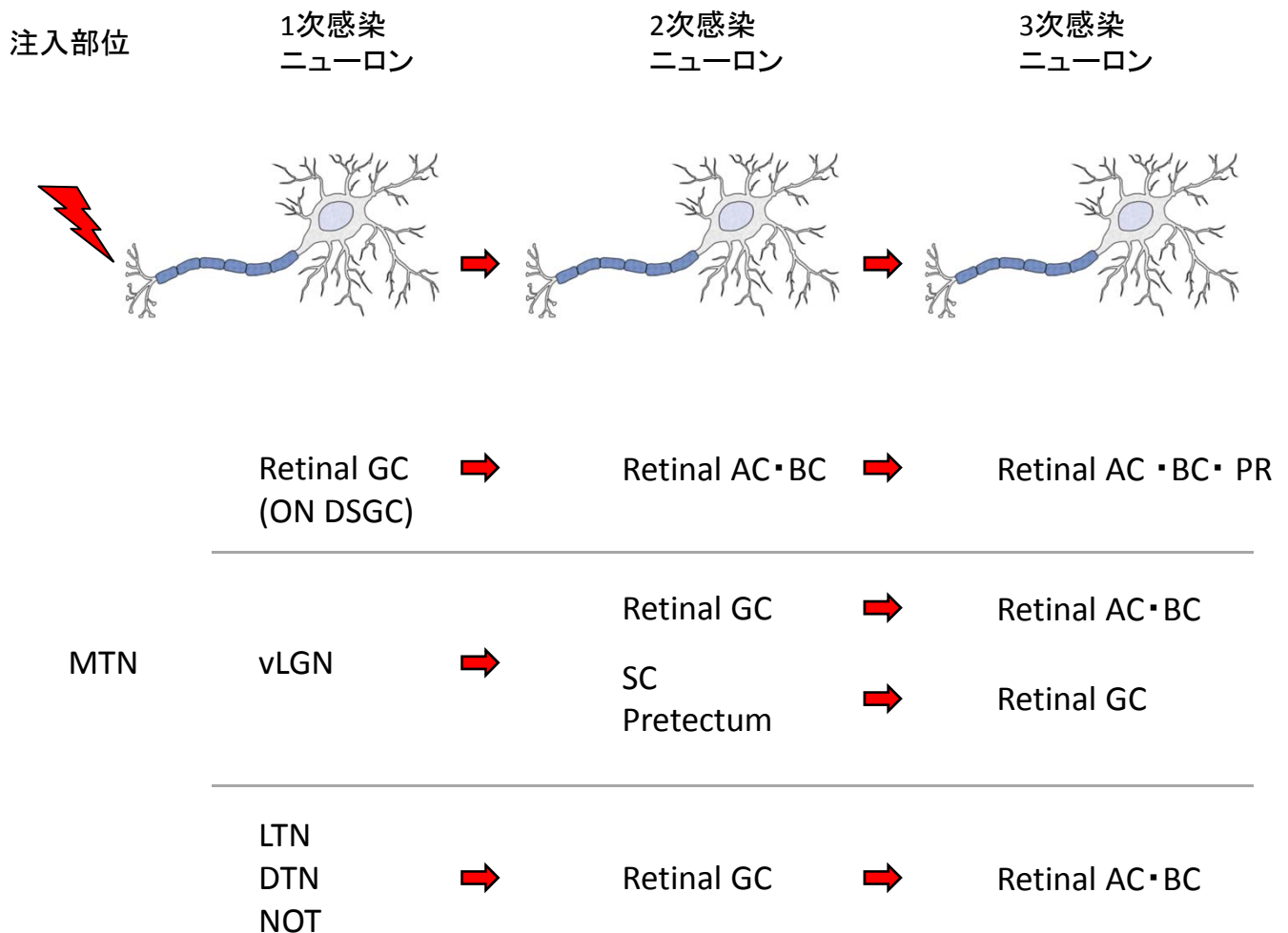


図3.4 MTNに逆行性越シナプス性トレーサーを注入した時の感染経路

MTNは、ON型DSGCの投射先であり、他の核(vLGN, LTN, DTN, NOT)のニューロンの投射先でもある。上段:ON型DSGCはアマクリン細胞(AC)や双極細胞(BC)の入力を受ける。ACはBCやACから入力を受け、BCは視細胞(PR)やACから入力を受ける。中段:vLGNは網膜の神経節細胞(GC)、上丘(SC)、視蓋前野(pretectum)から入力を受ける。GCはAC、BCから入力を受け、SCやpretectumは網膜のGCから入力を受ける。下段:LTN、DTN、NOTは網膜のGCからの入力を受ける。GCはAC、BCから入力を受ける。

MTN: medial terminal nucleus, BC: bipolar cell, AC: amacrine cell, PR: photoreceptor, vLGN: ventral lateral geniculate nucleus, SC: superior colliculus, LTN: lateral terminal nucleus, DTN: dorsal terminal nucleus, NOT: nucleus of optic tract.

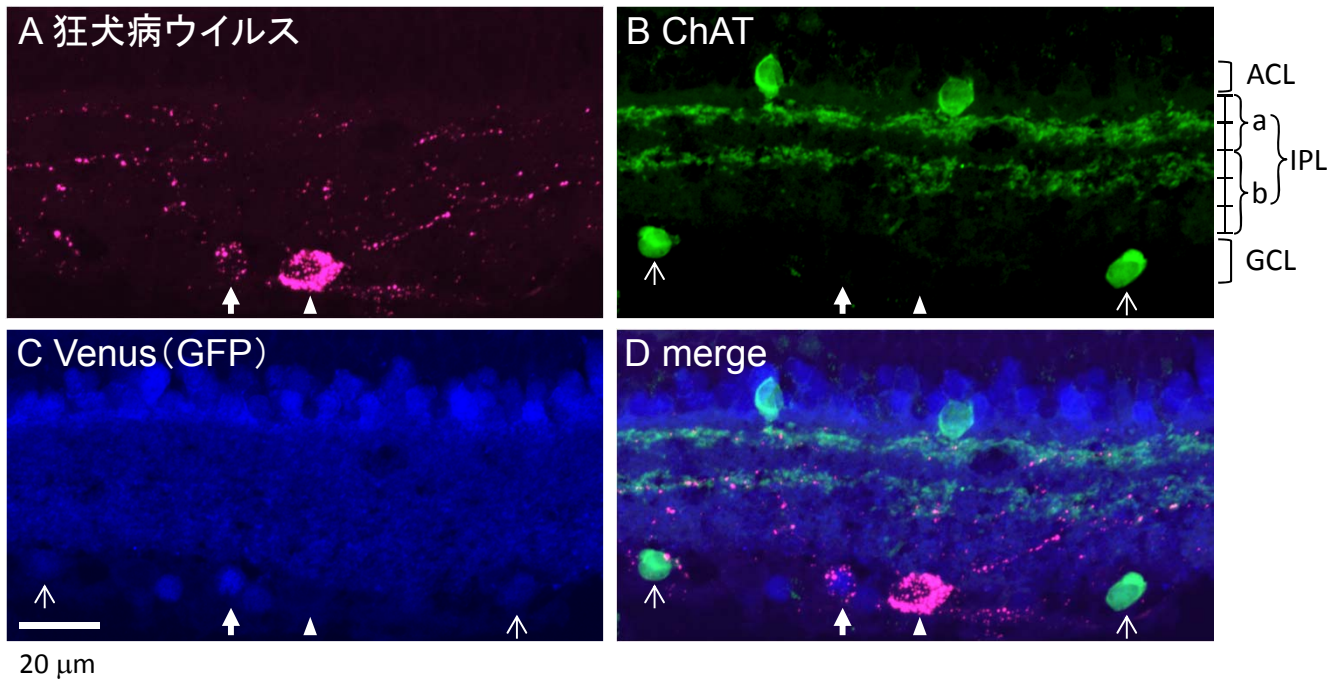


図3.5 狂犬病ウイルスをMTNに注入し、2.5日後の網膜を多重染色したもの

A: 狂犬病ウイルスに対する抗体によって染色した。神経節細胞層のニューロンがラベルされた。濃くラベルされた細胞(矢じり)と薄くラベルされた細胞(太矢印)が観察され、それぞれ一次感染ニューロン(ON型DSGC)と、二次感染ニューロンだと思われる。B: 抗ChAT(choline acetyltransferase)抗体によって染色した。SACがラベルされている。C: 蛍光タンパクのVenusをGFPの抗体を用いて染色した。GABA作動性のアマクリン細胞がラベルされている。Aにおいてウイルスの抗体で濃くラベルされた細胞(矢じり)はGFP陰性なので神経節細胞、薄くラベルされた細胞(太矢印)はGFP陽性なのでアマクリン細胞であることが分かる。D: ABCを重ねて表示したもの。狂犬病ウイルスでラベルされた二次ニューロンは、starburstアマクリン(SAC)細胞ではなかった。

ACL: アマクリン細胞層、IPL: 内網状層、a: a層(OFF層)、b: b層(ON層)、GCL: 神経節細胞層。

DSGC の運動方向選択性を形成しているといわれている SAC は、ON 型 DSGC においては、関与が少なく、SAC 以外の GABA 作動性のアマクリン細胞が ON 型 DSGC に多くシナプス結合していることが示唆された。

3-4 SAC は狂犬病ウイルスに感染するのか？

狂犬病ウイルスに感染すると、ウイルスの増殖により、細胞が本来必要とするタンパク質合成が阻害される可能性がある。そのために、SAC で ChAT の合成が抑制されてしまい、免疫染色でラベルされなかった可能性が否定できない。しかし、生存時間を 3.5 日に延ばした条件では、ウイルスに感染した細胞も抗 ChAT 抗体で染色することができた(図 3.6、矢印)。したがって、ウイルスに感染して ChAT の合成が阻害されたために、狂犬病ウイルス(+)かつ ChAT(+)の細胞がなかったのではなく、ON 型 DSGC と直接シナプスを作っている SAC が少なかったことが原因だと考えられる。そして、生存時間を 1 日延長したことで狂犬病ウイルス(+)かつ ChAT(+)の細胞が増えたことから、ON 型 DSGC と直接結合している SAC への感染が時間をかけて進んだか、あるいは、ON 型 DSGC からシナプスを 2 つ介して接続している SAC へ感染が広がった可能性が示唆された。

3-5 まとめ

VGAT-Venus rat に狂犬病ウイルスを注入し、2.5 日間生存させて、狂犬病ウイルスに感染した細胞の内、Venus(+)かつ ChAT(-)である細胞(つまり SAC 以外の GABA 作動性アマクリン細胞)の割合と、Venus(+)かつ ChAT(+)である細胞(つまり SAC)の割合を比較した(図 3.7)。なお、多くのウイルス(+)細胞が神経節細胞層に存在したため、ここでは神経節細胞層におけるウイルス感染細胞について解析した。Venus(+)かつ ChAT(-)細胞の割合は平均 $18.04 \pm 0.04\%$ だったのに対して、Venus(+)かつ ChAT(+)細胞の割合は平均 $1.38 \pm 0.01\%$ と少なかった($n = 5$, 狂犬病ウイルス感染細胞合計: 3,124 個、 $p = 0.0105$)。また生存時間を 3.5 日にした場合、ウイルス感染細胞の内、Venus(+)かつ ChAT(+)の割合は平均 $6.66 \pm 0.01\%$ に増加した($n = 3$, 狂犬病

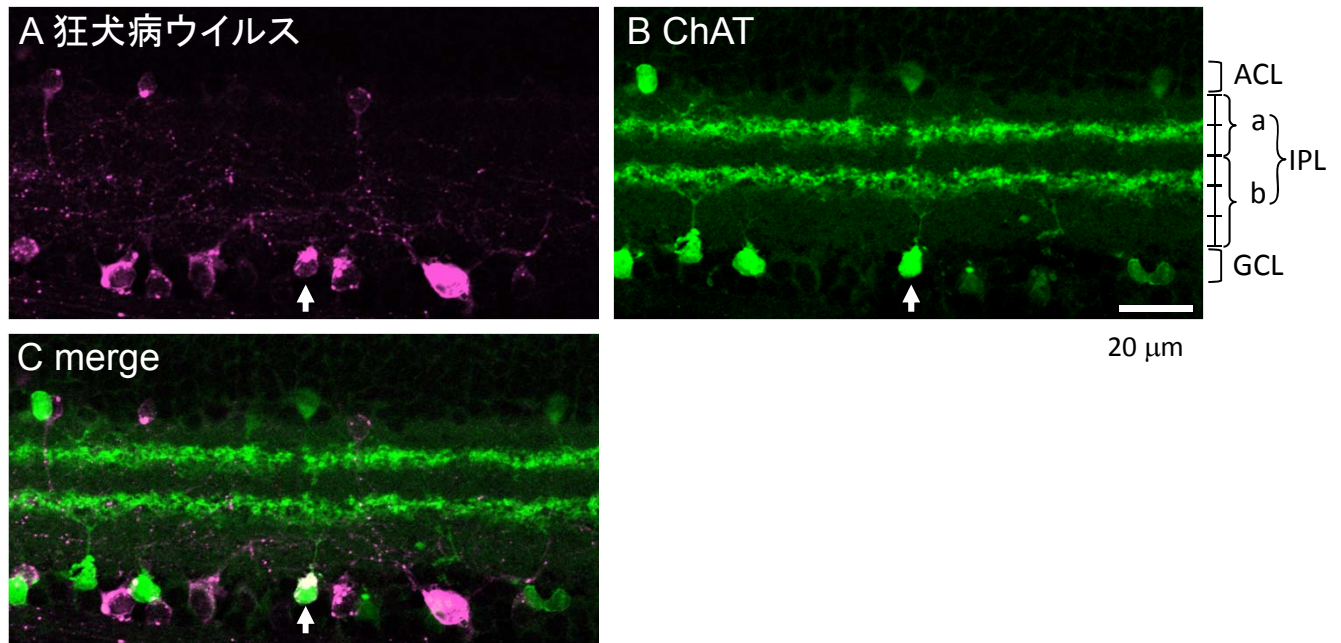


図3.6 狂犬病ウイルスをMTNに注入し、3.5日後の網膜

A: 狂犬病ウイルスに対する抗体で染色した。神経節細胞層に加え、アマクリン細胞層にもラベルが確認できる。B: 抗ChAT (choline acetyltransferase) 抗体によって染色した。SACがラベルされている。矢印で示した細胞は、狂犬病ウイルスの抗体でもラベルされている(A参照)ので、SACがウイルスに感染していることが分かる。C: AとBを重ねて表示したもの。Starburstアマクリン細胞もウイルスでラベルされた。

ACL: アマクリン細胞層、IPL: 内網状層、a: a層(OFF層)、b: b層(ON層)、GCL: 神経節細胞層。

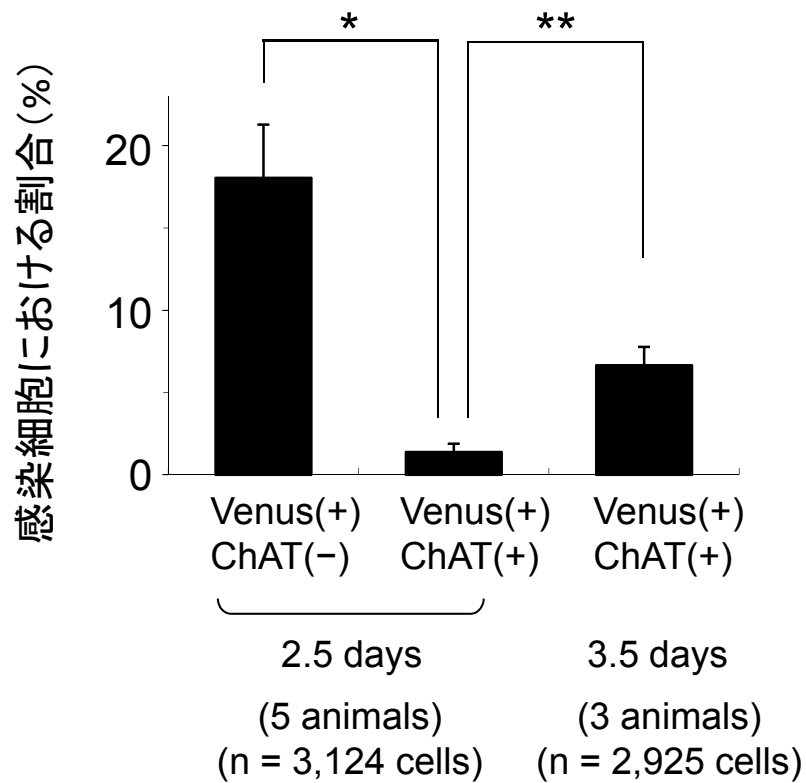


図3.7 狂犬病ウイルスでラベルされたStarburst (SAC) アマクリン細胞と、それ以外のGABA作動性アマクリン細胞の割合

狂犬病ウイルス注入後2.5日では、狂犬病ウイルスでラベルされた細胞(3,124 cells)の内、SAC(Venus(+), ChAT(+))は $1.38 \pm 0.01\%$ であったのに対して、SAC以外のGABA作動性アマクリン細胞(Venus(+), ChAT(-))の割合は $18.04 \pm 0.04\%$ と有意に高かった($p < 0.05$)。ウイルス注入後3.5日では、2.5日と比較してウイルスでラベルされたSACの割合が有意に増加した($p < 0.01$)。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

ウイルス感染細胞合計:2,925 個) (生存時間 2.5 日 Venus(+)かつ ChAT(+)との比較、 $p = 0.00564$)。以上のことから、SAC よりもその他の GABA 作動性アマクリン細胞の方が、ON 型 DSGC に対して有意に多くシナプス結合していることが明らかになった。また、SAC は、生存時間を 1 日延長すると狂犬病ウイルスに感染する細胞が有意に増加した。このことから、狂犬病ウイルスによって ChAT の合成が阻害され、狂犬病ウイルス(+)の細胞が ChAT の抗体でラベルできないわけではないことが示された。

4. 考察

4-1 狂犬病ウイルスの感染

狂犬病で死亡した人間においてさえも、神経病理学的な変性は少ないか全くないといわれている(Ugolini, 1995)。狂犬病ウイルスによる細胞変性が少数で、変性の開始が遅いのは、ウイルスが細胞の DNA や RNA、たんぱく質の合成を阻害しないからだと考えられている。もしそれが事実だとすると、SAC の ChAT の合成が狂犬病ウイルスによって阻害されて、狂犬病ウイルスの抗体と、ChAT の抗体の両方でラベルされる細胞が少なかったという可能性は低いと思われる。事実、本実験で感染からの時間を延長すると狂犬病ウイルスに感染した SAC が増加したので、ウイルス陽性細胞が全く ChAT の抗体でラベルされないわけではないだろう。

生存時間を 1 日延長することで狂犬病ウイルスに感染した SAC が増加する理由としては、2 つの可能性が考えられる。まず第 1 の可能性は、SAC が ON 型 DSGC とシナプス結合している割合が少ないため、2 次感染ニューロンではあるが、SAC に感染が広がるまでには時間がかかったという可能性である。第 2 の可能性は、ON 型 DSGC と直接シナプス結合している SAC はほとんどなく、生存時間を 1 日延長することで増加したのは、3 次感染ニューロンとしてラベルされるものが出てきたからだという可能性である。どういう経路で SAC が 3 次感染ニューロンとして感染するかについては、複数の可能性がある。まず、ON 型 DSGC とシナプス結合している SAC 以外の GABA 作動性アマクリン細胞から感染したという可能性である。もう一つの可能性は、MTN 以外の神経核を経由し

ている可能性である。ウイルスを注入した MTN は DTN, LTN, NOT, vLGN という神経核からも投射を受けており(図 3.4)、2.5 日経つと、これらの核に投射する網膜神経節細胞が 2 次感染ニューロンとしてラベルされる。そして 3.5 日経つと、その神経節細胞のシナプス前細胞が 3 次感染ニューロンとしてウイルスに感染する。つまり SAC が DTN, LTN, NOT, vLGN に投射する神経節細胞に inputs を送っている場合、3 次感染ニューロンとしてラベルされるということになる。このように、様々な可能性があるため、この結果から SAC と ON 型 DSGC とのシナプス結合が、直接なのか間接なのかについては断定することは難しい。

4-2 ON 型 DSGC に入力する細胞

Yonehara ら(Yonehara *et al.*, 2011; Yonehara *et al.*, 2013)は、狂犬病ウイルスがシナプスを越えて次の細胞に侵入するために必要な糖タンパク質(glycoprotein:G タンパク)を欠損させた改変型ウイルスを、G タンパクを供給するウイルスとともに ON 型 DSGC に感染させる実験を行っている。狂犬病ウイルスは ON 型 DSGC においてのみ G タンパクの供給を受け、ON 型 DSGC から次のシナプス前細胞へ侵入することができる。しかし、それ以上は G タンパクがないため感染していない。この実験では狂犬病ウイルスが 1 シナプスしか越えないことが保証されているため、狂犬病ウイルス注入から 5 日から 12 日間待って網膜を観察している。この場合には、SAC 以外のアマクリン細胞にも感染は確認できるが、SAC や双極細胞にも狂犬病ウイルスへの感染が見られる。本実験では狂犬病ウイルス注入からの時間は 2.5 日間だったため、SAC へのウイルスの感染はごくわずかだったと考えられる。また双極細胞への感染は全く見られなかった。狂犬病ウイルスの感染速度は、その細胞への inputs の大きさと強い相関がある(Ugolini, 1995)。したがって、双極細胞や SAC の ON 型 DSGC への inputs は、今回観察された SAC 以外の GABA 作動性アマクリン細胞よりも、小さいということが推測される。

4-3 ON 型 DSGC に入力する GABA 作動性アマクリン細胞

本実験では、SAC 以外の異所性 GABA 作動性アマクリン細胞が ON 型 DSGC と多くシナプス結合しているということが示唆された。しかし、ウイルス感染した細胞は細胞体を染色できても、樹状突起などはほとんど染色されなかったので、細胞全体の形態を詳細に観察することができなかった。細胞全体を染色するには、ウイルス感染した細胞に電極を刺入して細胞内染色する手法も考えられるが、固定もせずに狂犬病ウイルスが未だ存在している組織で電気生理学的実験を行うのはあまりに危険である。そのため、この実験ではウイルス感染したアマクリン細胞のサブタイプを形態学的に同定するには至らなかった。そもそも、神経節細胞層にある異所性の GABA 作動性アマクリン細胞には、どのくらいのサブタイプが存在するのだろうか。次章では、Venus で標識されている異所性 GABA 作動性アマクリン細胞に電極を刺入し、形態学的・電気生理学的に分類することを試みた。そして、どのサブタイプが ON 型 DSGC と結合可能なのかを検討した。

第 4 章 異所性アマクリン細胞の性質

1. 目的

第 3 章で Starburst amacrine cell (SAC) 以外の異所性 GABA 作動性アマクリン細胞が狂犬病ウイルスに感染し、ON 型 DSGC とシナプス結合していることが示唆された。では、異所性 GABA 作動性アマクリン細胞には、どのくらいのサブタイプが存在するのだろうか。本章では、GABA 作動性ニューロンが Venus によって標識されている VGAT-Venus rat (第 3 章 2-1 参照) を用い、神経節細胞層に存在する標識された細胞にパッチクランプ法を適用して、細胞の膜特性と形態についての解析を行った。

2. 方法

VGAT-Venus rat を用い、Venus を発現したアマクリン細胞を標的としてホールセル記録を行った。それ以外の方法は全て第 2 章と共通であった。

アマクリン細胞の膜特性を検討するために、ホールセルクランプ法を適用し、膜電流固定下で、細胞に様々な強度の電流を注入した。多くの場合は、0 pA に膜電流を固定しておき、0 pA からある値 (-30 pA ~ +160 pA) までの矩形波パルスを 200 ミリ秒間与え、細胞がスパイクを発生させるか否かを検討した。また、スパイクを発生させた場合には、個々のスパイクの閾値、ピーク値と半値幅、また、スパイク列のピークの時間経過に伴う減衰率を検討した。スパイクの閾値、ピーク値、半値幅については、電流の注入量が少ない順にスパイク波形を 5 つ選び、その平均値をその細胞の代表値とした。スパイクの閾値は、波形の 2 階微分のピーク値を算出して求めた。つまり、波形の傾きが最も大きく変化する部分 (スパイクの立ち上がりの部分) をスパイクの閾値と定義し、その時刻の膜電位を求めた。ピーク値はスパイクのピークの膜電位の値、半値幅は、スパイクの振幅を閾値からピーク値までとしたとき、振幅が半分になる部分 (上昇中、下降中の 2 か所) の時間幅を取った。スパイク列のピークの減

衰率は、電流注入中に最もスパイク数が多かった試行を選び、最初のスパイクのピーク値から最後のスパイクのピーク値を差し引いたものを、最初のスパイクの振幅で正規化したものを用いた。

ガラス管電極から細胞内に Neurobiotin を導入し、実験後に固定、染色して形態を観察した。また、記録したアマクリン細胞が内網状層のどの位置に樹状突起を伸ばしているのかを検討するために、同時に Starburst amacrine cell (SAC) も免疫染色した。写真は共焦点レーザー顕微鏡により撮影した(第2章2-6参照)。

アマクリン細胞は40倍の対物レンズ(Plan Apo 40X DIC, Nikon Instruments Inc.)で細胞体付近の拡大写真を、20倍の対物レンズ(Plan Apo VC 20X DIC, Nikon Instruments Inc.)で全体像を撮影した。アマクリン細胞の軸索が広域に広がっている場合は、20倍の対物レンズによりタイリング撮影し、ソフトウェア NIS-Elements (Nikon Instruments Inc.) で合成した。フォトレッツソフト GIMP2 により、写真画像にレイヤーを重ね、アマクリン細胞をトレースした。

樹状突起の広がっている範囲(dendritic field)の直径や、細胞体の直径は、NIS-Elements (Nikon Instruments Inc.)を用いて計測した。多角形で範囲を指定し、面積を計測して、円に換算した場合の直径を算出した。

3. 結果

異所性アマクリン細胞の分類を行った論文は非常に数少なく、ラットについては Perry & Walker (1980)の論文が1篇あるのみである。また、マウスについても異所性アマクリン細胞に主眼を置いて書かれているのは1篇だけ(Müller *et al.*, 2007)である。本論文ではこの Müller ら(2007)の論文をベースにして異所性アマクリン細胞の分類を試みた。アマクリン細胞というのは、本来軸索をもたない細胞だが、軸索をもつアマクリン細胞の存在も報告されており(Famiglietti, 1992a; Famiglietti, 1992b; Famiglietti, 1992c; Volgyi *et al.*, 2001; Lin & Masland, 2006)、本実験でも多数の軸索をもつアマクリン細胞が観察できた。軸索は、樹状突起と以下の点で異なっている。一つは、太さである。樹状突起が細胞体から離れるにしたがって細くなっていくのに対して、軸索は

均一な太さである。枝分かれの際も、別れた軸索も元の軸索と同じ太さである。次に枝分かれの角度である。樹状突起は $45\sim 70^\circ$ で枝分かれするのに対して、軸索は $90\sim 120^\circ$ という広い角度で枝分かれする(Famiglietti, 1992a)。また軸索は 1 本かそれ以上存在するので、このような細胞を polyaxonal amacrine cell と呼ぶ。神経節細胞の軸索との違いは、神経節細胞の軸索が眼球を出て視神経となり脳へ投射するのに対して、アマクリン細胞の軸索は網膜内にとどまっていることである。また、多くの場合アマクリン細胞では軸索が複数存在する点でも異なる。本研究では Müller ら (2007) の分類に従って、樹状突起の広がっている範囲 (dendritic field) が、直径 $200\sim 500\text{ }\mu\text{m}$ のものを Medium-field amacrine cell (MA)、 $500\text{ }\mu\text{m}$ 以上のものを Wide-field amacrine cell (WA) とした。また WA は、さらに Polyaxonal amacrine cell (PA) とそれ以外のアマクリン細胞に分類した。また、Müller ら (2007) と同様、ラットの網膜においても、dendritic field の直径が $200\text{ }\mu\text{m}$ 以下の異所性アマクリン細胞は存在しなかった。

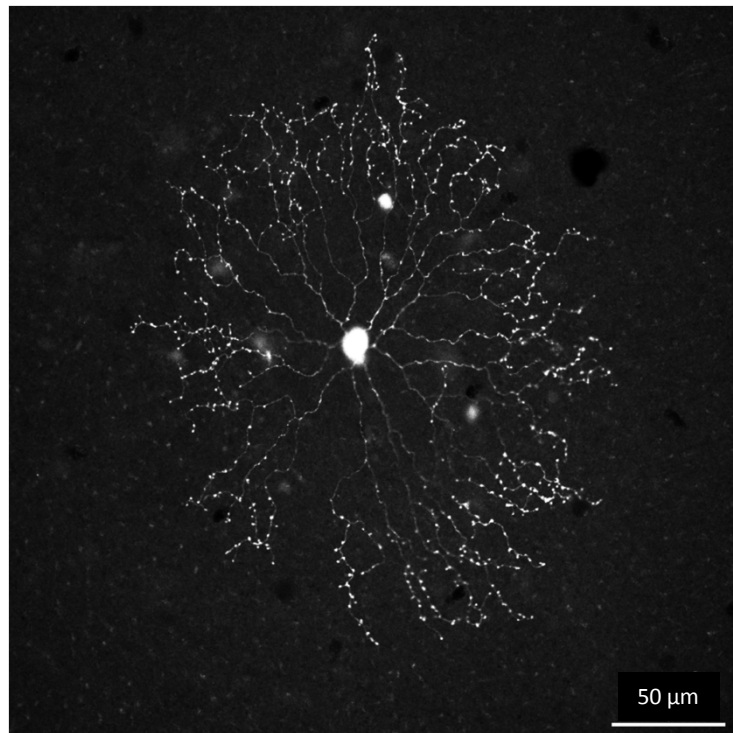
3-1 Medium-field displaced amacrine cells

[MA-S1] Müller ら (2007) は MA-S1 として内網状層の第 1 層に樹状突起を伸ばしている細胞を分類しているが、これに対応する細胞は、ラットでは今回見つけることができなかった。

[Starburst amacrine cell] 異所性アマクリン細胞の 87% を占めるといわれており、非常に特徴的な樹状突起の形態をしている (Müller et al., 2007)。ラットにおいてもこの細胞が見いだされた (図 4.1)。4 本以上の primary dendrite (細胞体から最初に分岐する樹状突起) を持ち、末端の $1/3$ にはたくさんの varicosity (こぶ) が存在した。細胞の直径は $11.86 \pm 0.9\text{ }\mu\text{m}$ 、dendritic field の直径は $245.02 \pm 17.0\text{ }\mu\text{m}$ であった ($n = 4$)。この細胞は脱分極性電流を注入してもスパイクを発生させなかった。

[MA-S5] 内網状層の第 5 層に樹状突起を伸ばす細胞である。樹状突起の広がり方は非対称であり、樹状突起は長く、低密度で、ときどき短い樹状突起が枝分かれしていた (図 4.2)。樹状突起の特徴は Müller ら (2007) の分類したものと非常に似通っているが、樹状突起が 1 mm 以上伸びてい

A



B

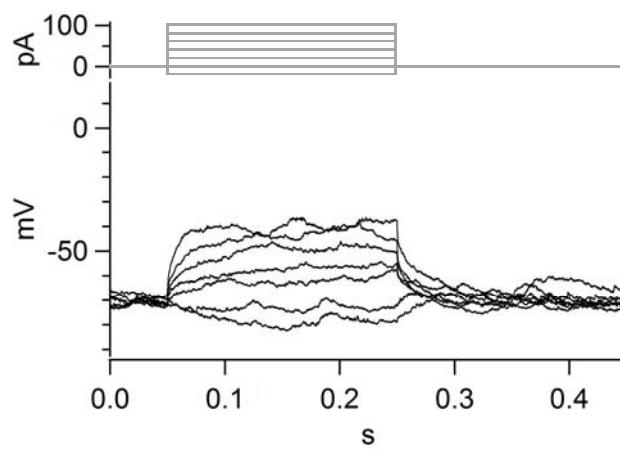


図4.1 Starburst amacrine cell (SAC)

A: Neurobiotinを注入してラベルしたSACを共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。スケールバー: 50 μm . B: 電流パルスを入力した時の膜電位の変動。0 pAの状態から-20~100 pAの電流パルスを入力した。スパイクは発生しなかった。

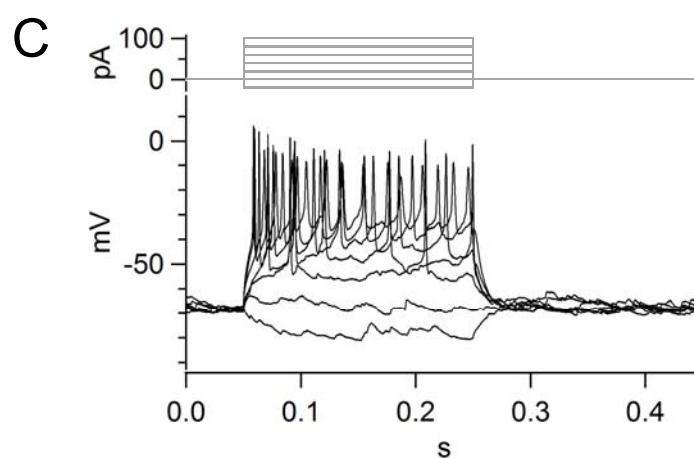
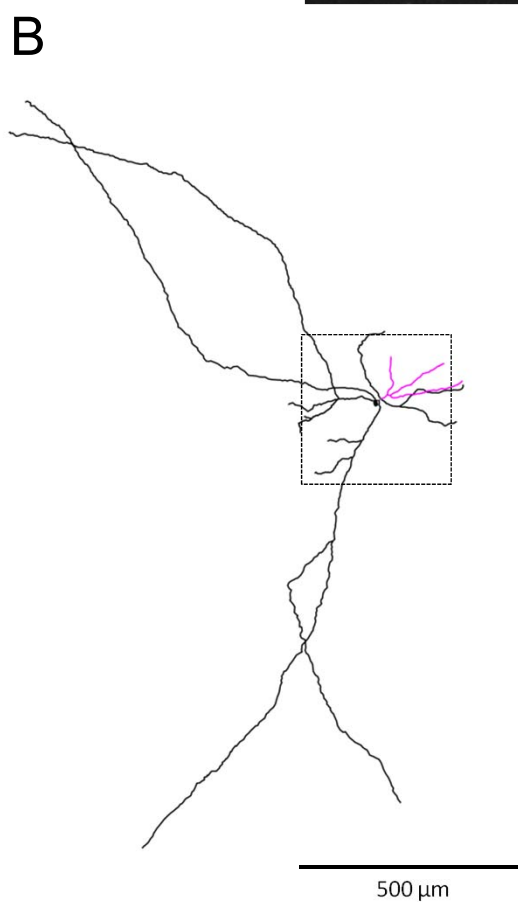
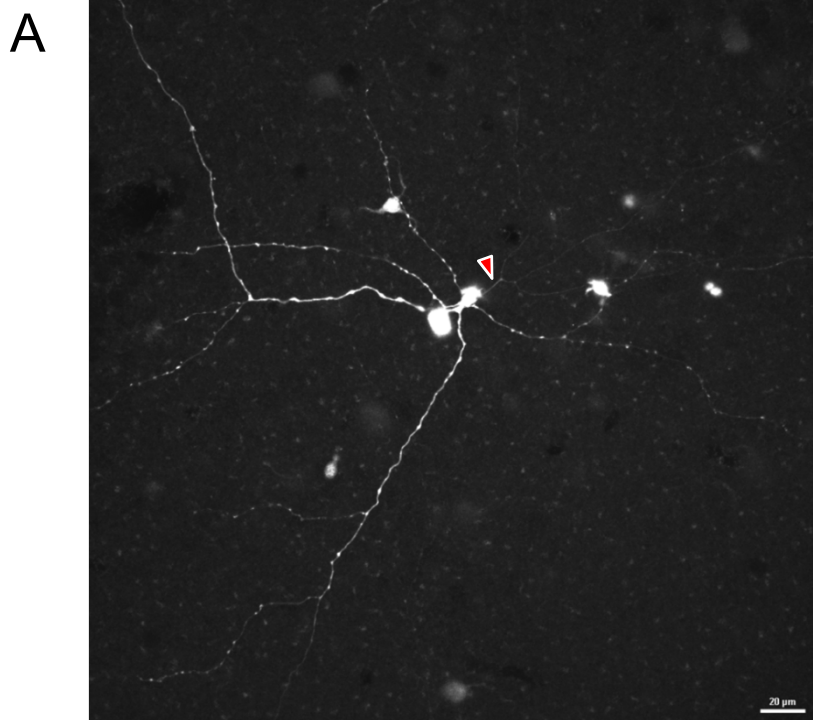


図4.2 MA-S5

A: Neurobiotinを注入してラベルしたMA-S5を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。赤矢じり: 軸索様プロセス。スケールバー: 20 μm 。 B: 広域のタイリング写真から作成したトレース画。黒: 樹状突起、マゼンタ: 軸索。 C: 電流パルスを入力した時の膜電位の変動。0 pAの状態から-20~100 pAの電流パルスを入力した。スパイクが発生した。

るので、WA に分類するべきであろう。この長い樹状突起は、途中から軸索になっているのかもしれない。Müller ら(2007)の写真も途中から切れているので、やはり同じ種類の細胞だと思われる。よく観察すると、細いプロセスが樹状突起と反対側に伸びていた(図 4.2 矢じり)。一般的な軸索とは異なるかもしれないが、樹状突起とは明らかに異なるプロセスである。細胞体の直径は、11.59 μm 、dendritic field の直径は 1208.71 μm であった($n = 1$)。この細胞は脱分極性の電流を注入すると、スパイクを発生させた。

[MA-S1/S5] 内網状層の第 1 層と第 5 層に樹状突起を伸ばしている細胞である。Müller ら(2007)の発見したものは、第 1 層(OFF 層)の樹状突起の方が第 5 層(ON 層)の樹状突起よりも大きく密であったが、今回発見したもの(図 4.3A)は、第 5 層(ON 層)の樹状突起の方が大きく密で(図 4.3C)、第 1 層(OFF 層)の樹状突起は 2 本ほど見えているだけであった(図 4.3D)。また、第 5 層の樹状突起は第 5 層だけに限局しているのではなく、第 4 層あたりまで広がりを持っていた。樹状突起は spine(とげ)に富み、無秩序に枝分かれしていた。この細胞にも一見して軸索のようなものは見当たらないが、よく見ると細胞体から樹状突起とは異なる spine のない細いプロセスが出ていた(図 4.3B)。細胞体の直径は 10.39 μm 、dendritic field の直径は 300.89 μm であった($n = 1$)。脱分極性電流の注入に対しては、スパイクを発生させた。

3-2 Wide-field displaced amacrine cells

[WA-S1] 樹状突起は細胞体近くで枝分かれした後、枝分かれせずにまっすぐに伸びて 1 層で広がる細胞である。本実験では樹状突起の終端まで追うことができなかったが、少なくとも dendritic field の直径は 700 μm 以上はあった(図 4.4)。樹状突起の層は、細胞体の近くは 4/5 層で、周辺ではいくつかの樹状突起は 2/3 層にまで伸びていた。したがって、WA-S1(第 1 層)という名前はふさわしくない。Müller ら(2007)は樹状突起が蝶ネクタイのようにある方位にだけ伸びているものを WA-S1 と呼んでいる。本実験で見つかったものは、Perry & Walker (1980b)のいう type(a) wide-field unistratified amacrine cell に似ており、全方向に樹状突起を伸ばしていた。また、異

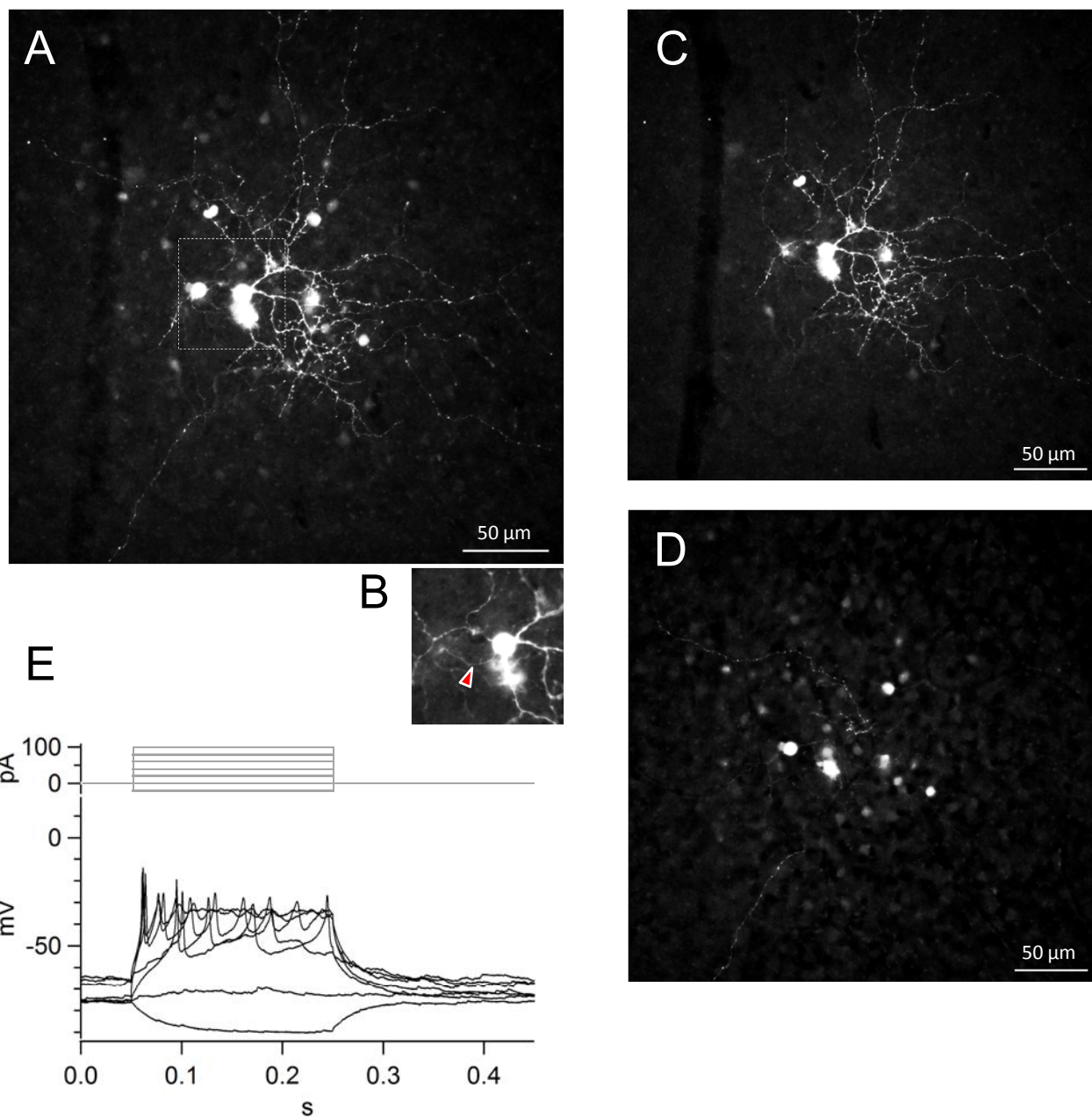
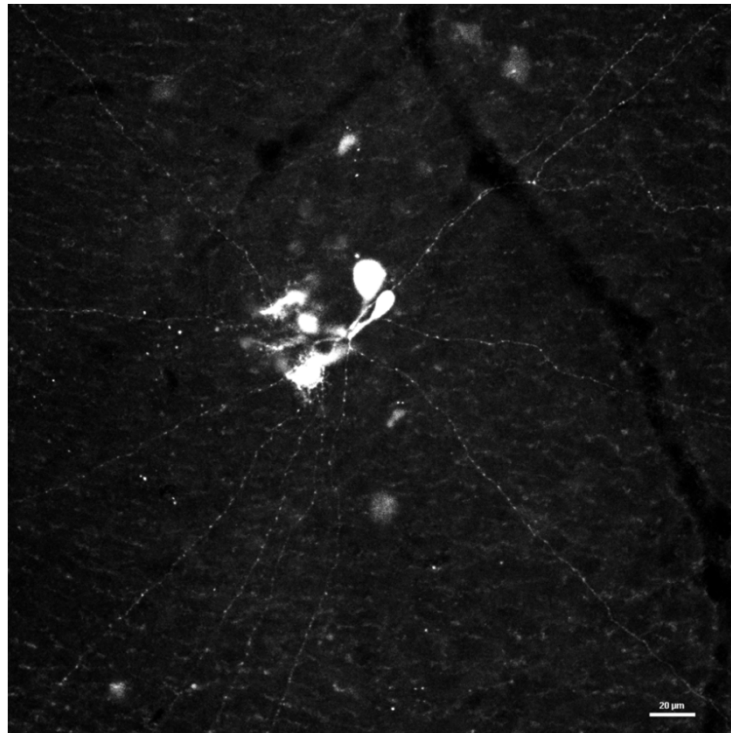


図4.3 MA-S1/S5

A: Neurobiotinを注入してラベルしたMA-S1/S5を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。スケールバー: 50 μm . B: Aの点線で囲んだ部分の拡大図。赤矢じり: 軸索様プロセス。C: ON層の樹状突起。スケールバー: 50 μm . D: OFF層の樹状突起。スケールバー: 50 μm . E: 電流パルスを入力した時の膜電位の変動。0 pAの状態から-20~100 pAの電流パルスを入力した。スパイクが発生した。

A



B

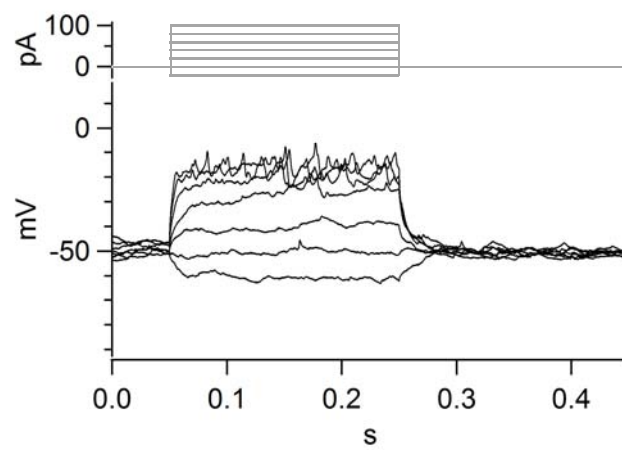


図4.4 WA-S1

A: Neurobiotinを注入してラベルしたSACを共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。スケールバー: 20 μm . B: 電流パルスを注入した時の膜電位の変動。0 pAの状態から-20~100 pAの電流パルスを入力した。スパイクは発生しなかった。

所性ではないが、Lin & Masland (2006)の WA-A2とも樹状突起の形状が同じである。この細胞体の直径は、13.86 μm であった ($n = 1$, 樹状突起のみのものを含めると $n = 2$)。この細胞は、脱分極性電流を注入してもスパイクを発生させることはなかった。

[WA-S3] 樹状突起は第 3 層に広がるとされているが(Müller et al. 2007)、ChAT の層と重なる位置(第 4 層)に局限していた(図 4.5)。したがって WA-S4 とすべきだろう。樹状突起の枝分かれは少なく、細胞体から放射状に延びていた。Dendritic field の直径は 949.85 μm にもなった(図 4.5A, B) (完全に計測できたものは $n = 1$)。WA-S1 ほどまっすぐではなく、WA-S1 よりも varicosity が多かった。細胞体の直径は、10.71 \pm 0.5 μm ($n = 6$) であった。脱分極性電流を注入しても、スパイクは発生しなかった。

[A17] Müller ら(2007) は遺伝子改変マウスを用いて EGFP(enhanced GFP) でラベルされた細胞に蛍光色素を注入し異所性 A17 を見つけた。彼らも、遺伝子改変マウスを使わないと見つけれなかったと報告しているが、ラットでは今回見つけることができなかった。

[Multistratified WA] 樹状突起は、第 1 層から第 5 層まで複数の層に伸びている細胞である Müller ら(2007)。ラットでも、樹状突起は複数の層に伸びており、よじれが多い特徴的な形状をしていた(図 4.6)。Müller ら(2007) は指摘していないが、第 5 層では、軸索が非常に広範囲(直径 2 mm 以上)に張り巡らされていた(図 4.6A, B)。Badea & Nathans (2004)らの A1 に相当すると思われる。軸索を除く dendritic field の直径は 332.45 \pm 14.12 μm であり、細胞体の直径は 12.76 \pm 2 μm であった ($n = 2$)。脱分極性電流の注入によってスパイクを発生させた。

3-2-1 Polyaxonal amacrine cells

[PA-S1] 樹状突起は、細胞体の近くは全て第 4/5 層に伸ばしており(図 4.7B)、いくつかの樹状突起は第 1 層まで樹状突起を伸ばしていた(図 4.7C)。軸索は細胞体に近い場所から分岐し、直径 1 mm 以上にわたって広がっていた。軸索は第 5 層に局限して伸びていた。細胞体の大きさは 13.56 μm 、軸索を除く dendritic field の直径は 345 μm であった ($n = 1$)。脱分極性電流の注入

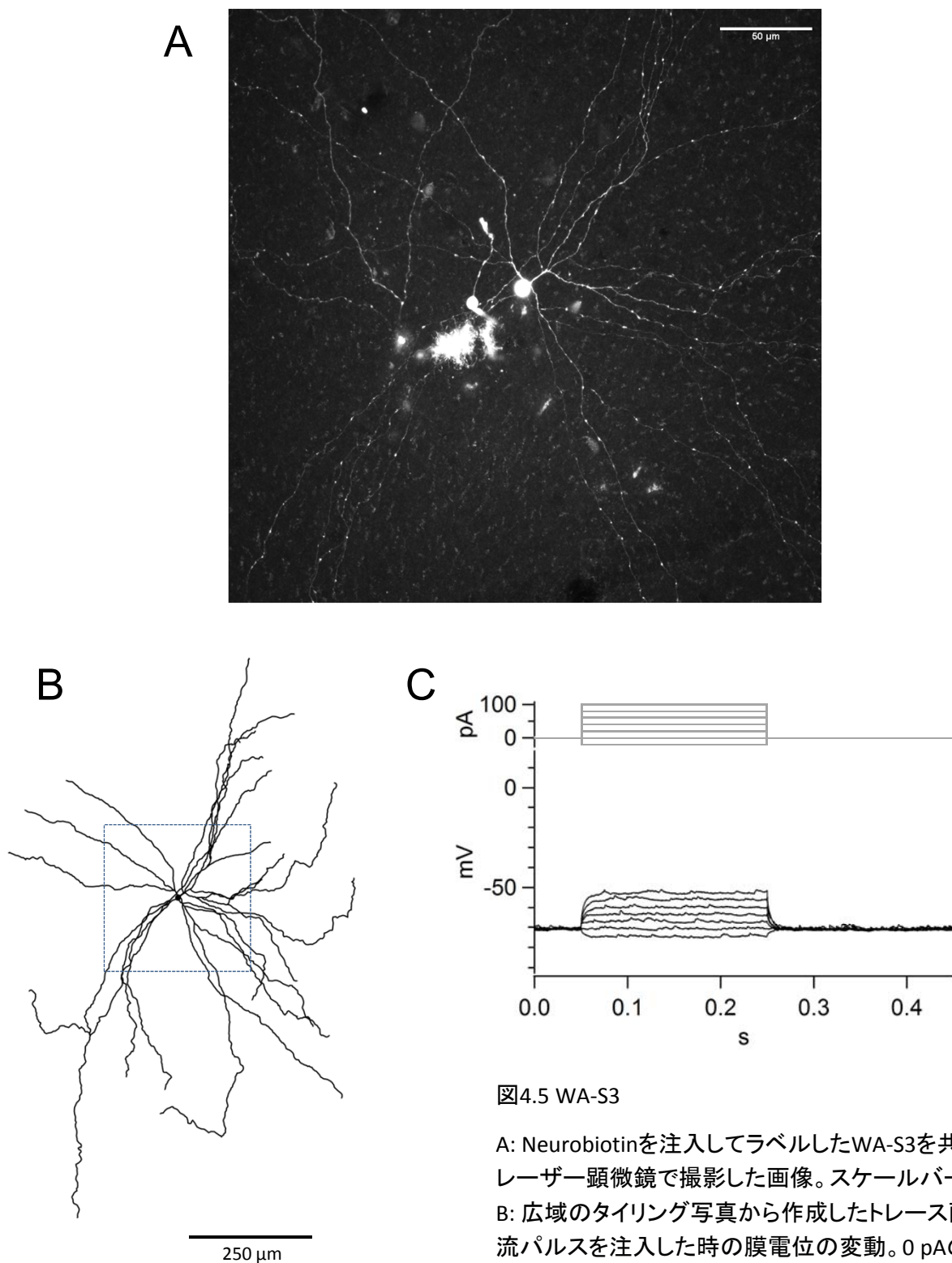
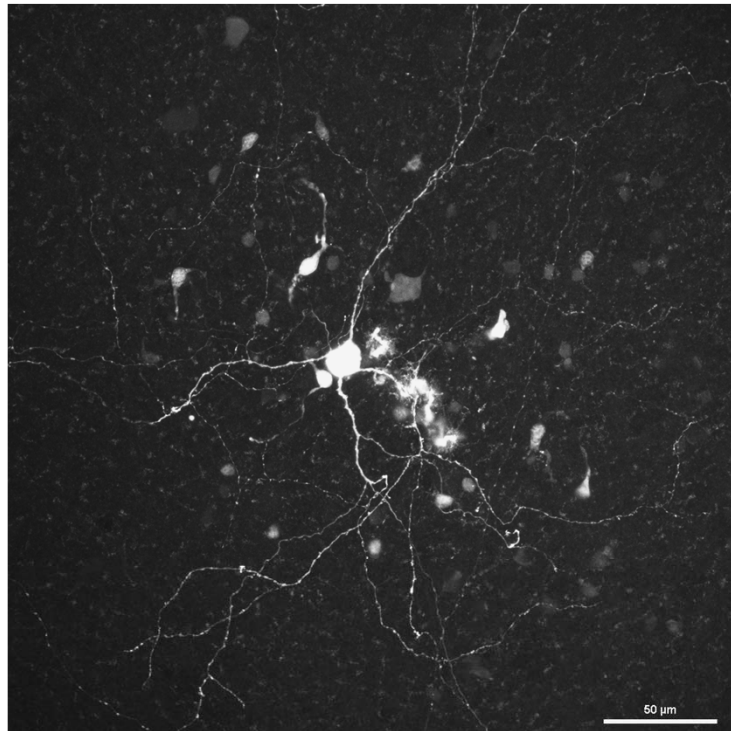


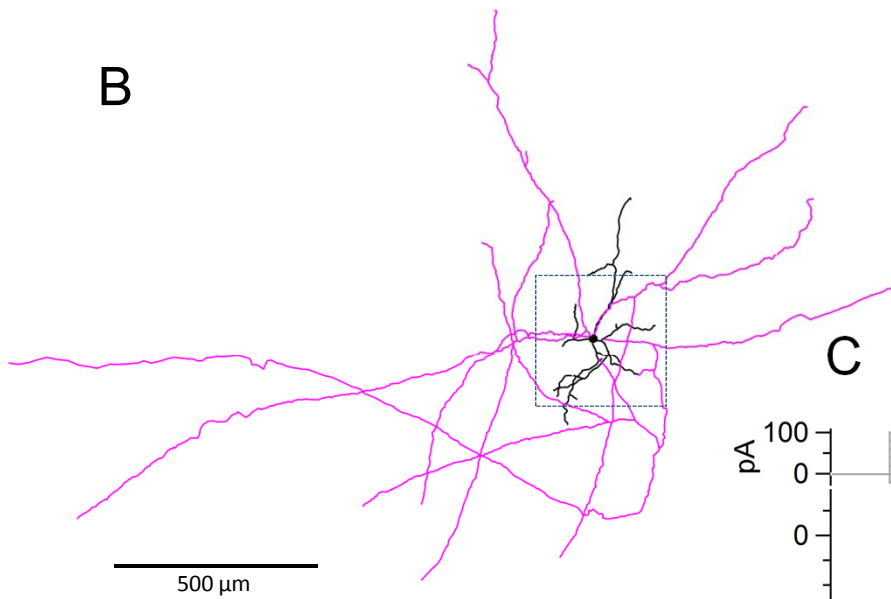
図4.5 WA-S3

A: Neurobiotinを注入してラベルしたWA-S3を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。スケールバー: $50\ \mu\text{m}$.
 B: 広域のタイリング写真から作成したトレース画。C: 電流パルスを注入した時の膜電位の変動。0 pAの状態から $-20\sim 100\ \text{pA}$ の電流パルスを入力した。スパイクは発生しなかった。

A



B



C

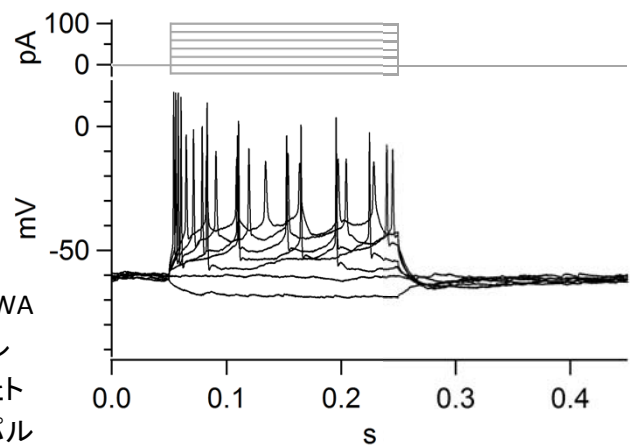


図4.6 Multistratified WA

A: Neurobiotinを注入してラベルしたMultistratified WAを共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。スケールバー: 50 μm . B: 広域のタイリング写真から作成したトレース画。黒: 樹状突起、マゼンタ: 軸索。C: 電流パルスを入力した時の膜電位の変動。0 pAの状態から-20 ~ 100 pAの電流パルスを入力した。スパイクが発生した。

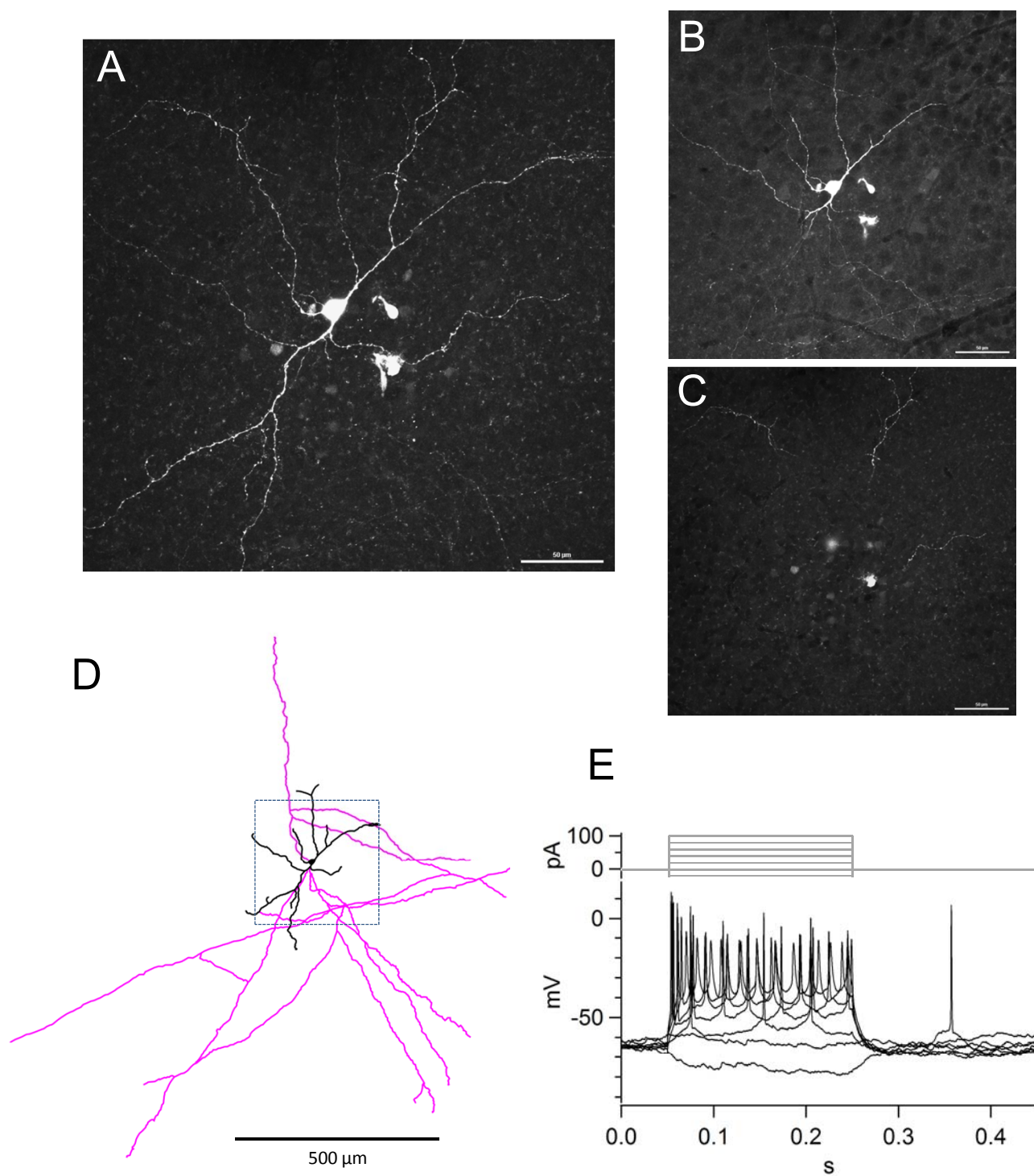


図4.7 PA-S1

A: Neurobiotinを注入してラベルしたPA-S1を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。スケールバー: 50 μm . B: ON層の樹状突起。スケールバー: 50 μm . C: OFF層の樹状突起。スケールバー: 50 μm . D: 広域のタイリング写真から作成したトレース画。黒: 樹状突起、マゼンタ: 軸索。E: 電流パルスを注入した時の膜電位の変動。0 pAの状態から-20~100 pAの電流パルスを入力した。スパイクが発生した。

によってスパイクを発生させた。

[PA-S5] 樹状突起は主に第 5 層に伸びていた。軸索も第 5 層に局限されていた。Famiglietti (1992b)の PA2 に相当する。この polyaxonal AC にはいくつかのバリエーションがあると思われる。以下、樹状突起と軸索の違いに基づいて 3 種類に分類した。

[PA-S5-1] 樹状突起はまっすぐに伸びていて、主に第 5 層、場合によっては第 4 層まで伸びていた(図 4.8)。primary dendrite が 2~3 本細胞体から分岐していた。軸索は細胞体から直接分岐することもあれば、細胞体から 150 μ m 程度離れた樹状突起の枝分かれ地点から分岐することもあった。4~6 本の軸索が細胞体もしくは樹状突起の分岐点から分岐した。細胞体の直径は、 $12.15 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 、軸索を除いた dendritic field の直径は $468.76 \pm 20.0 \mu\text{m}$ であった ($n = 4$)。脱分極性電流を注入することによって、時間と共にピーク値が減衰しない、幅の狭いスパイクを発生させた。

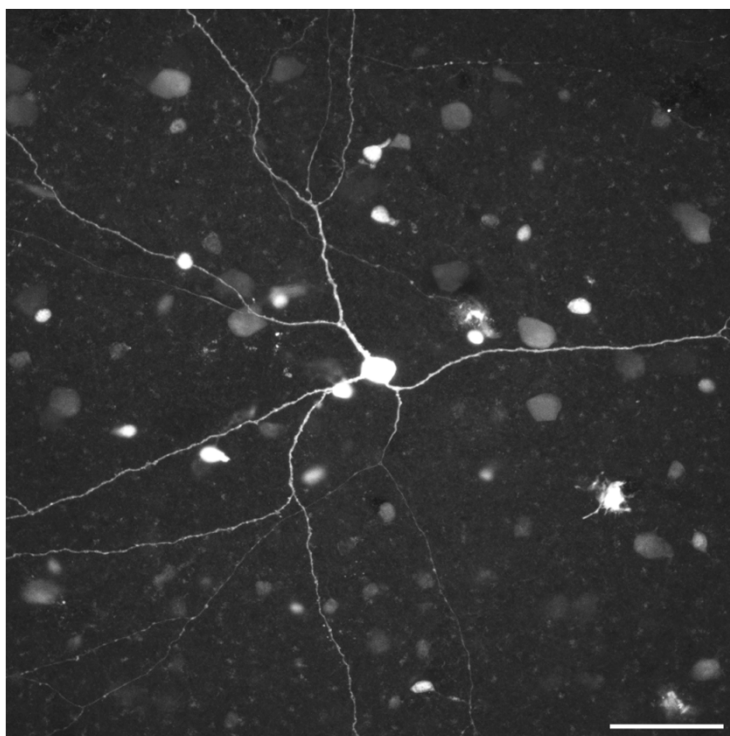
[PA-S5-2] 樹状突起は、PA-S5-1 よりも varicosity に富み、PA-S5-1 よりも曲がりくねっていた(図 4.9)。一部の樹状突起は OFF 層へ分岐した。軸索は 2~3 本が、細胞体もしくは細胞体に近い樹状突起の分岐点から分岐した。細胞体の直径は $10.26 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 、dendritic field の直径は $283.24 \pm 39.73 \mu\text{m}$ であった ($n = 2$)。脱分極性の電流注入に対して、スパイクを発生させたが、PA-S5-1 よりも 2 発目以降の振幅の減少が激しかった。

[PA-S5-3] 曲がりくねった樹状突起が長く伸び、dendritic field の直径は $879.98 \pm 333.58 \mu\text{m}$ にもなった(図 4.10)。軸索は 1 本であった。細胞体の直径は、 $8.83 \pm 0.18 \mu\text{m}$ であった ($n = 2$)。脱分極性電流の注入によってスパイクを発生させたが、2 発目以降のスパイクの振幅は大きく減衰した。

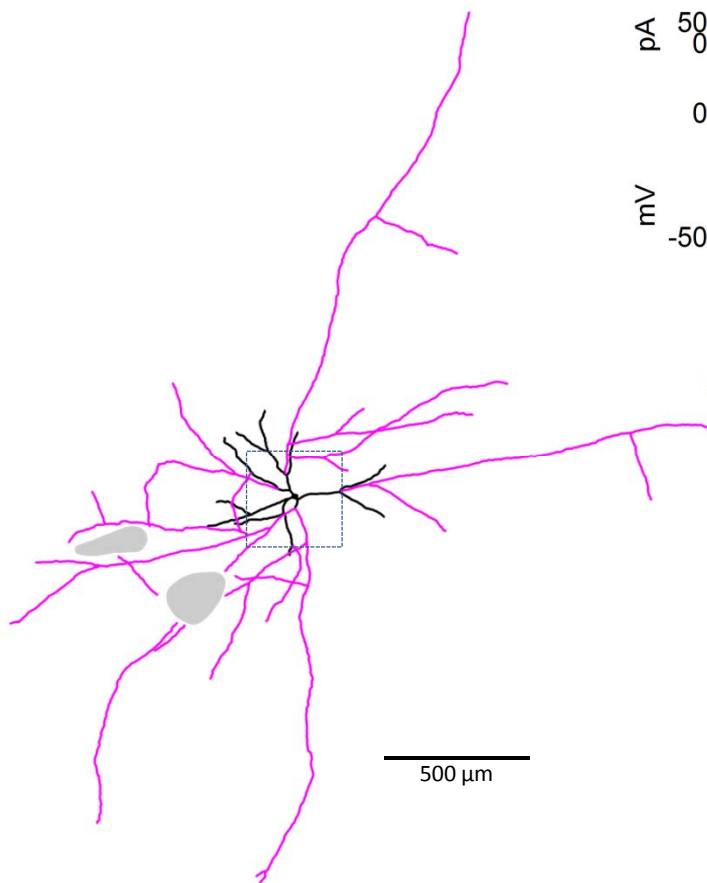
3-3 スパイク波形の比較

電流の注入によりスパイクを発生させたものについて、スパイクの閾値、ピーク値、半値幅、スパイク列のピークの減衰率について検討した(図 4.11)。また、ON 型、ON-OFF 型 DSGC のスパイクについてもこれらのパラメーターについて算出し、比較対象とした。一般的に、神経節細胞のスパイクのピ

A



B



C

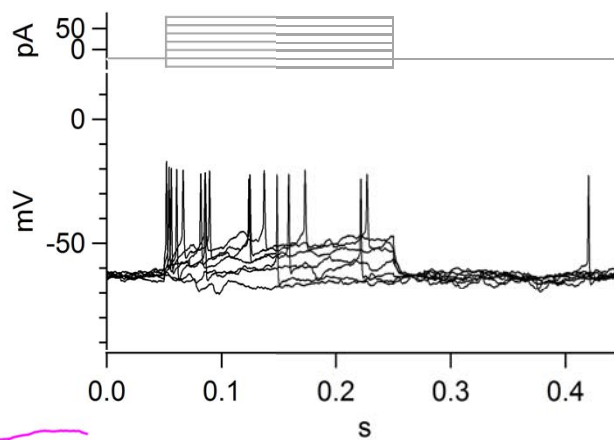


図4.8 PA-S5-1

A: Neurobiotinを注入してラベルしたPA-S5-1を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。スケールバー: 50 μm . B: 広域のタイリング写真から作成したトレース画。黒: 樹状突起、マゼンタ: 軸索。灰色領域: 網膜が陥没していたためトレースできなかった部位。C: 電流パルスを入力した時の膜電位の変動。-23 pAの状態から-20~+100 pAの電流パルスを入力した。スパイクが発生した。

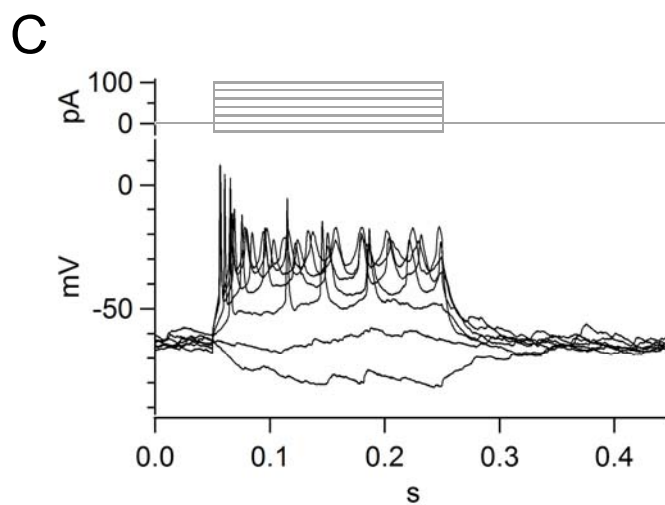
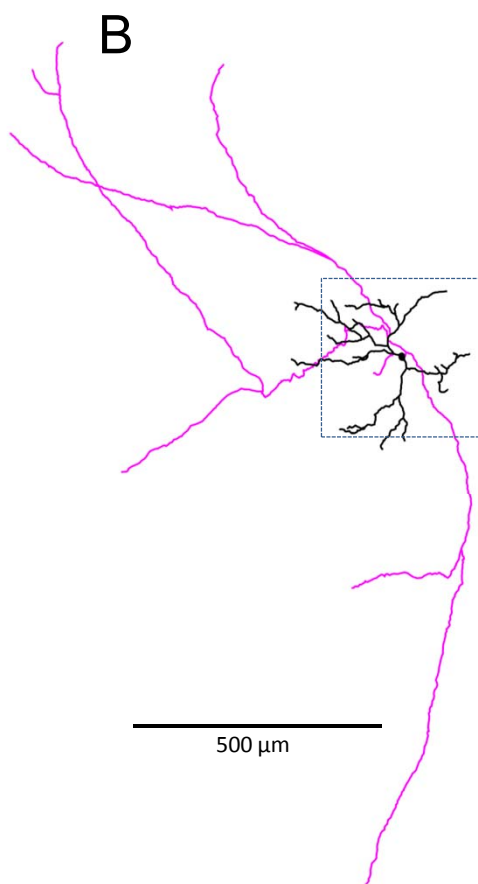
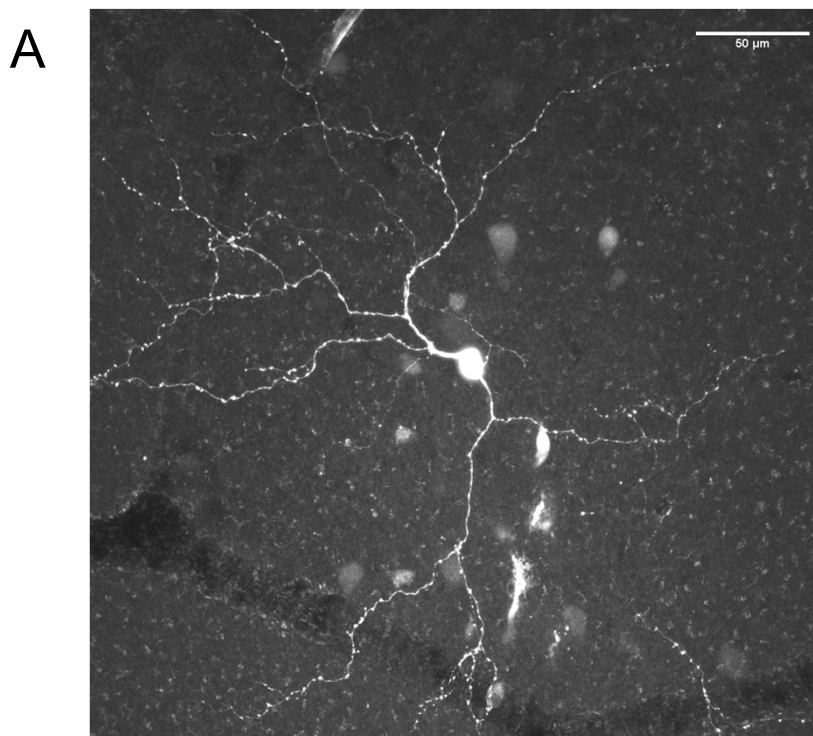


図4.9 PA-S5-2

A: Neurobiotinを注入してラベルしたPA-S5-2を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。スケールバー: 50 μm . B: 広域のタイリング写真から作成したトレース画。黒: 樹状突起、マゼンタ: 軸索。C: 電流パルスを入力した時の膜電位の変動。0 pAの状態から-20~100 pAの電流パルスを入力した。スパイクが発生した。

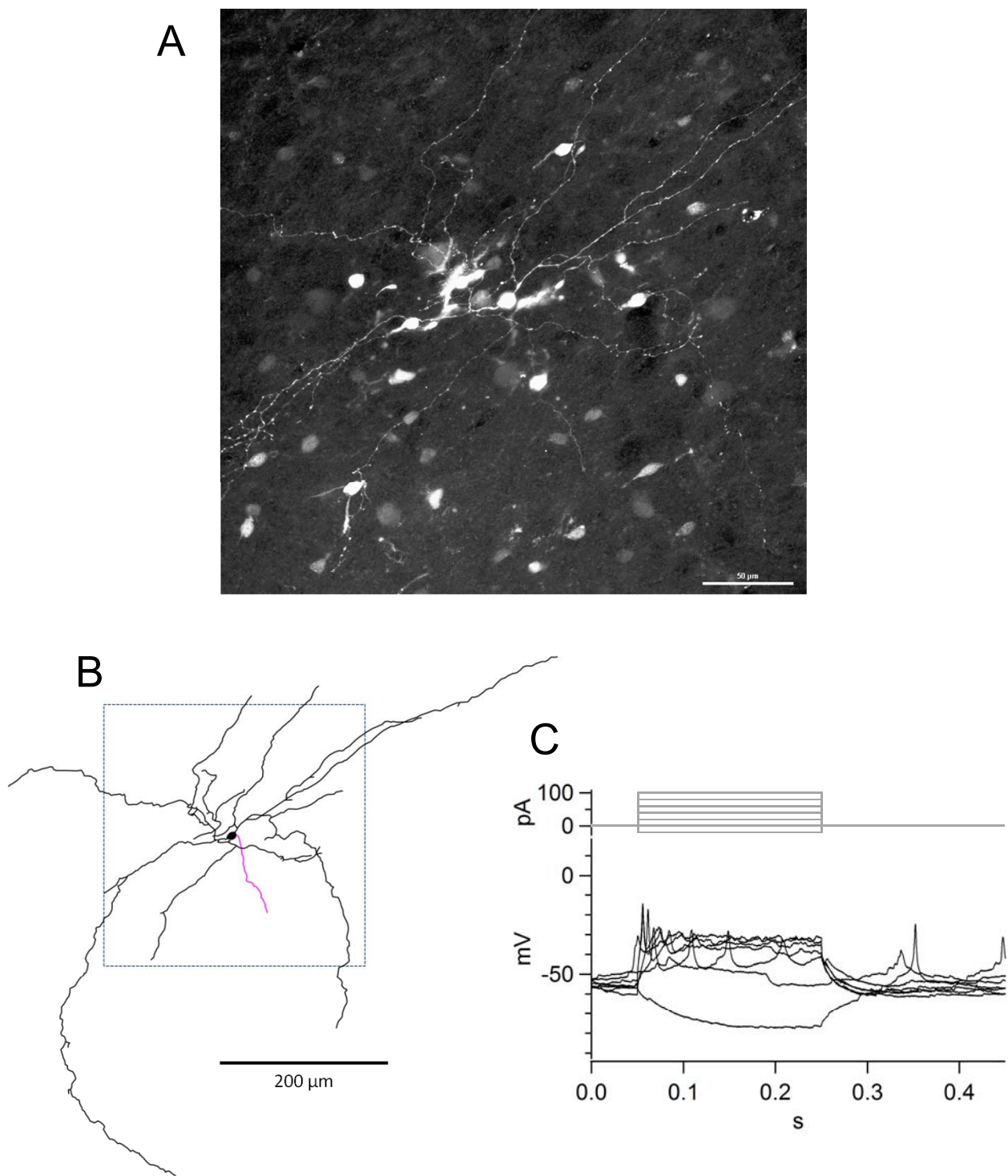


図4.10 PA-S5-3

A: Neurobiotinを注入してラベルしたPA-S5-3を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像。スケールバー: 50 μm . B: 広域のタイリング写真から作成したトレース画。黒: 樹状突起、マゼンタ: 軸索。C: 電流パルスを入力した時の膜電位の変動。0 pAの状態から-20~100 pAの電流パルスを入力した。スパイクが発生した。

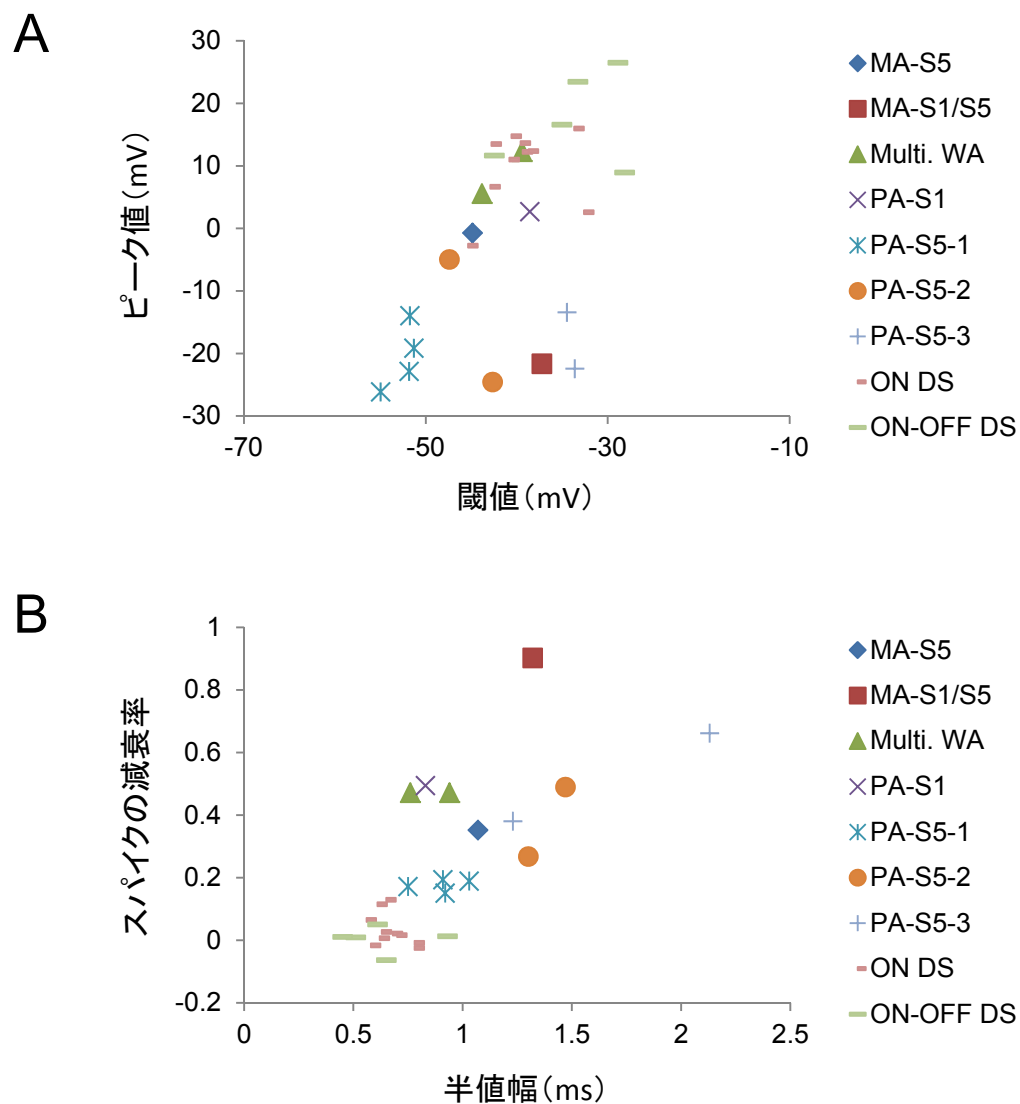


図4.11 アマクリン細胞のスパイクと神経節細胞のスパイクの比較

A: スパイクを発生させた異所性GABA作動性アマクリン細胞について、スパイクの閾値とピークの膜電位で各細胞をプロットした。比較のため、ON型、ON-OFF型DSGCのデータも一緒にプロットした。B: Aと同じ細胞群について、スパイクの半値幅とスパイクの減衰率で各細胞をプロットした。スパイクの減衰率は、1発目のスパイクのピーク値から最後のスパイクのピーク値を引き、1発目のスパイクの振幅で正規化した値を用いた。

ーク値は 0 mV を越える(オーバーシュートする)が、アマクリン細胞でオーバーシュートしたのは、Multistratified WA、MA-S5、PA-S1 の 3 種類のみで、他のアマクリン細胞は 0 mV に達しなかった。また閾値も細胞によって異なり、PA-S5-1 などは神経節細胞と比較して、約 20 mV ほど閾値が低かった。また、スパイクの半値幅は神経節細胞が一番狭く、次に PA-S5-1 が狭かった。連続してスパイクが発生したときのピークの減衰率を計算すると、神経節細胞はほとんどスパイクが減衰することがなかった。PA-S5-1 は神経節細胞の次に減衰率が少なく、持続してスパイクを出し続けることが分かった。一方、MA-S1/S5 は減衰率が大きく、ほとんど 1 発しかスパイクを出せないことが分かった。

4. 考察

本章では、Venus でラベルされた GABA 作動性アマクリン細胞にパッチクランプ法を適用し、Neurobiotin による詳細な形態観察を行うと共に、電流注入時のスパイク発火の有無を検討した。Müller ら(2007) の論文にしたがって、細胞を分類した。樹状突起が伸びている層の違い等があったものの、10 種類のうち、8 種類を確認することができた。また、彼らが指摘していなかった種類の細胞にも軸索様のプロセスがあることを発見した(MA-S5、MA-S1/S5 に関しては、樹状突起とは明らかに異なる細いプロセス、Multistratified WA では典型的な軸索)。また、全種類の細胞において、スパイク発火の有無を検討したところ、軸索様のプロセスを持つものはいずれもスパイクを発生させることが分かった。

4-1 スパイク発火するものは軸索をもつのか

これまで polyaxonal amacrine cell の軸索として紹介されているものは、細くまっすぐな軸索をミリ単位で伸ばし、大きな角度で分岐するものだが、そのような典型的なアマクリン細胞の軸索を持つものは、スパイクを発生させるという報告は既にあり(Volgyi *et al.*, 2001)、また今回の実験でも確認することができた(Multistratified WA、PA-S1、PA-S5-1、PA-S5-2)。今回はスパイクを発生させる

アマクリン細胞で、このような典型的なアマクリン細胞の軸索を持たないものにもスパイク発火が観察された。つまり明らかに樹状突起よりも細いプロセスが1本出ていて、軸索が樹状突起を越えて大きく広がっていたりしないものである(MA-S5, MA-S1/S5, PA-S5-3)。Famiglietti (1992b)が指摘するPA2の軸索が1本のものに似ているのかもしれない。もともと、これらの細いプロセスは途中で見えなくなってしまういたり、切れている場合が多いため、実際の軸索の長さはわかりづらい。典型的な軸索を持たないのにスパイクを発生させるものとしては、AII アマクリン細胞が挙げられるだろう(Boos *et al.*, 1993; Veruki & Hartveit, 2002a; Veruki & Hartveit, 2002b; Tamalu & Watanabe, 2007)。lobular appendages(AII アマクリン細胞がスパイクを伝えるところ)を軸索様のプロセスと考えられるのかどうかはわからないが、典型的な軸索を持たなくてもスパイクを発生させるアマクリン細胞があることは確かだと思われる。

4-2 内網状層内での軸索の位置

今回観察された軸索は全て第5層に広がっていた。これはウサギとは大きく異なる点である(Famiglietti, 1992b; Volgyi *et al.*, 2001)。今回は異所性のアマクリン細胞から記録したので、このような結果になったが、もし通常のアマクリン細胞層のアマクリン細胞にトレーサーを注入すれば、他の層に軸索を伸ばすアマクリン細胞が見つかるのかもしれない。また、ウサギの場合、この通常のアマクリン細胞の変異としての異所性アマクリン細胞がたくさん見られるのかもしれない。

4-3 スパイク波形と機能

今回、アマクリン細胞から分岐していく軸索の数が最も多かったのが、PA-S5-1であった。この細胞のスパイクは発火の閾値が低く、ピーク値も低い、連続発火してもスパイクが減衰せず、速い(半値幅の狭い)スパイクを発生させることができた。スパイク発火の閾値が低いということは、わずかな入力でいち早くスパイクを出すことができるということであり、しかも継続して発火できるため、張り巡らされた軸索を通じて広範囲にシグナルを伝えることができる。軸索というシステムをうまく使えるよう

な信号になっている。一方、典型的な軸索を持たない、MA-S1/S5 や、PA-S5-3 では、閾値は高く、ピーク値は低く、しかもすぐにスパイクが減衰してしまう。しかし、軸索の形状から、ごく近傍の細胞にシグナルを伝えることしかできないので、このスパイク発火でも十分ということなのだろう。このように、神経節細胞とは異なり、アマクリン細胞には様々なスパイクの波形と軸索の形状があり、それぞれに異なる機能を持っていると思われる。異所性ではないが、眼球運動などのグローバルな動きを検知して神経節細胞を抑制する polyaxonal amacrine cell があるという報告(Baccus *et al.*, 2008)や、異所性アマクリン細胞が神経節細胞の一過性の応答を形成しているという報告(Nirenberg & Meister, 1997)もあるが、まだまだ機能が明らかになっていないアマクリン細胞は多く存在する。今後の課題である。

なお、スパイクの伝導速度については、サルの網膜において、マルチ電極を用いて A1 アマクリン細胞だと思われる polyaxonal amacrine cell のスパイクの伝導速度を測定した研究が存在する(Greschner *et al.*, 2014)。これによると、polyaxonal amacrine cell のスパイクの伝導速度は、同時記録した OFF parasol cell(神経節細胞)に比べて3倍ほど遅い。その理由として、網膜内では神経節細胞の軸索も無髄であるため、おそらく、神経節細胞に比べてアマクリン細胞では軸索の太さが細いためであろう。また、アマクリン細胞では、スパイクの幅が広く振幅も小さいものが多いことからスパイクの発火に関与するナトリウムチャネルの密度が低いこと、軸索が複数に分岐していることなども伝導速度が遅くなる理由であると思われる。

4-4 アマクリン細胞のさらなる分類

本実験では、異所性アマクリン細胞を主に形態によって分類したが、形態による分類の他に、脳における介在ニューロンの分類によく用いられる方法としては、カルシウム結合タンパク質による分類がある(Kawaguchi & Kubota, 1997)。ラット網膜においても、水平細胞には calbindin が発現し(Hamano *et al.*, 1990)、AII アマクリン細胞には parvalbumin が発現(Wässle *et al.*, 1993)するなど、特定の神経細胞に特定のカルシウム結合タンパク質の発現がみられる。ラット網膜を用いて

parvalbumin の抗体で免疫染色を行うと、主に AII アマクリン細胞がラベルされるが、それ以外に、内顆粒層に細胞体をもち、内網状層の 1, 2 層に樹状突起を伸ばす wide-field アマクリン細胞もラベルされる。また少数ながら神経節細胞層の細胞もラベルされる(Wässle *et al.*, 1993)。Calbindin の抗体で免疫染色を行うと、水平細胞と、神経節細胞層の細胞が強くラベルされ、内顆粒層の細胞体も弱くラベルされる(Hamano *et al.*, 1990; Bastianelli *et al.*, 1995)。一方、Calretinin の抗体によって免疫染色を行うと、内顆粒層、神経節細胞層の細胞体がラベルされる。内網状層は 3 層がラベルされ、特徴的な 3 本の縞が観察できる(Bastianelli *et al.*, 1995)。神経節細胞層の細胞は神経節細胞と異所性アマクリン細胞である可能性がある。GAD67-GFP ノックインマウス(GABA の合成酵素である GAD67 をもつ細胞を GFP という蛍光タンパクによって標識した遺伝子改変マウス)を用いて、これらのカルシウム結合タンパク質との 2 重染色を行った研究(May *et al.*, 2008)では、異所性アマクリン細胞のうち、calretinin を発現していたものは 71.3%、parvalbumin を発現していたものは 1.3%、そして calbindin を発現していたものは 0%であった。ただし、ラット網膜では、starburst amacrine cell (SAC) が calretinin を発現しているため(Gábel & Witkovsky, 1998)、calretinin 陽性であった細胞の大部分が SAC である可能性が高い。VGAT-Venus rat において、calretinin と ChAT (SAC の指標)による多重染色を行い、SAC 以外の GABA 作動性アマクリン細胞で calretinin 陽性の細胞が存在すれば、より詳細に分類が可能になると思われる。

第 5 章 運動方向選択性の形成に関わるアマクリン細胞

1. 目的

異所性アマクリン細胞にはスパイクを発生させるものが多く存在した。ではこれらのアマクリン細胞のスパイク発火を阻害すると、ON 型 DSGC の運動方向選択性は消失するのだろうか。スパイクを発生させるためには、ナトリウムチャンネルが開き細胞外のナトリウムイオンが細胞内に流入することが必要となる。本章では、ON 型 DSGC から光応答を記録しながら、細胞外にナトリウムチャンネルの阻害剤である Tetrodotoxin (TTX) を灌流投与し、ON 型 DSGC の運動方向選択性が変化するかどうか検討した。

2. 方法

実験動物、トレーサの注入等は全て 2 章と同じであった。スパイク発火を阻害する TTX を灌流投与すると、当然記録している ON 型 DSGC のスパイク発火も阻害されてしまう。したがって、第 2 章のように、スパイク発火数によって運動方向選択性の有無を判断することはできない。ON-OFF 型 DSGC では、選好方向と非選好方向で SAC から非対称な抑制性入力を受けることによって運動方向選択性が形成されている。つまり、非選好方向において、選好方向よりも強い抑制性の入力を受けるので、非選好方向でスパイクの発生が抑制されている。したがって、入力を受けた結果生じる細胞の膜電位の変化ではなく、入力そのものを観察することでも、運動方向選択性の有無を判断できるということになる。ON 型 DSGC においても、マウスで少なくとも抑制性の入力に非対称性があることが報告されている(Sun *et al.*, 2006)。そこで、本実験でも、ON 型 DSGC の膜電位変化(スパイク発火)ではなく、入力としてのシナプス後電流を観察し、予め運動方向選択性の有無を確認しておいてから、TTX の効果について検討することにした。

シナプス伝達とは、シナプス前細胞が神経伝達物質を放出し、それがシナプス後細胞の受容体

に結合することによって特定のイオンチャネルが開き、シナプス後電流が発生し、それによってシナプス後細胞の膜電位が変化することを指す。第 2 章では ON 型 DSGC の膜電位の変化を観察したが、本章では、シナプス後電流を観察した。そのために、ON 型 DSGC に膜電位固定法を適用した。膜電位固定法とは、膜電位を測定しながら、特定の膜電位になるように随時電流を注入し、電位を一定に保つ方法である。この時、注入された電流量がそのとき膜を横切って流れた電流量と等しいので、これを計測した。

カリウムイオンは常に開いているチャネル(リークチャネル)から出入りし、膜電位固定を難しくするので、細胞内液は K^+ ではなく、 Cs^+ を主体とした(表 5.1)。また ON 型 DSGC に関しては初めから細胞内液に QX-314 を入れることでナトリウムチャネルを細胞内から阻害しておいて膜電流を観察した。細胞外への TTX の投与は、灌流している標準生理溶液に TTX を $0.5 \sim 1 \mu M$ 添加することで行った。

3. 結果

3-1 ON 型 DSGC への入力

CTB-Alexa Fluor 647 でラベルされた細胞を狙い、パッチクランプ法を適用した。まずガラス管電極を細胞膜に押しつけた状態(cell-attached mode)で、スパイク発火を記録し、ON 型 DSGC であるかどうかを確認した(図 5.1A)。この状態なら、まだ QX-314 が入った電極内液が細胞内へ流れ込んでいないので、スパイク発火を記録することができる。バー刺激に対する応答を記録し、運動方向選択性が確認された細胞において、細胞膜を破り、ホールセルモードに移行した。膜電位を固定し、膜電流を記録した。

イオンチャネルが開いた時、イオンの動向は、そのイオンの細胞内外の濃度勾配と細胞内外の電位勾配に左右される。細胞内外のイオン濃度は細胞内液と標準生理溶液を人工的に作っているので既知であり、その場合、イオンが移動しない電位(平衡電位)を Nernst の式から計算することができる。一般に、興奮性の伝達物質(グルタミン酸、アセチルコリン)が放出された場合、そのグルタミ

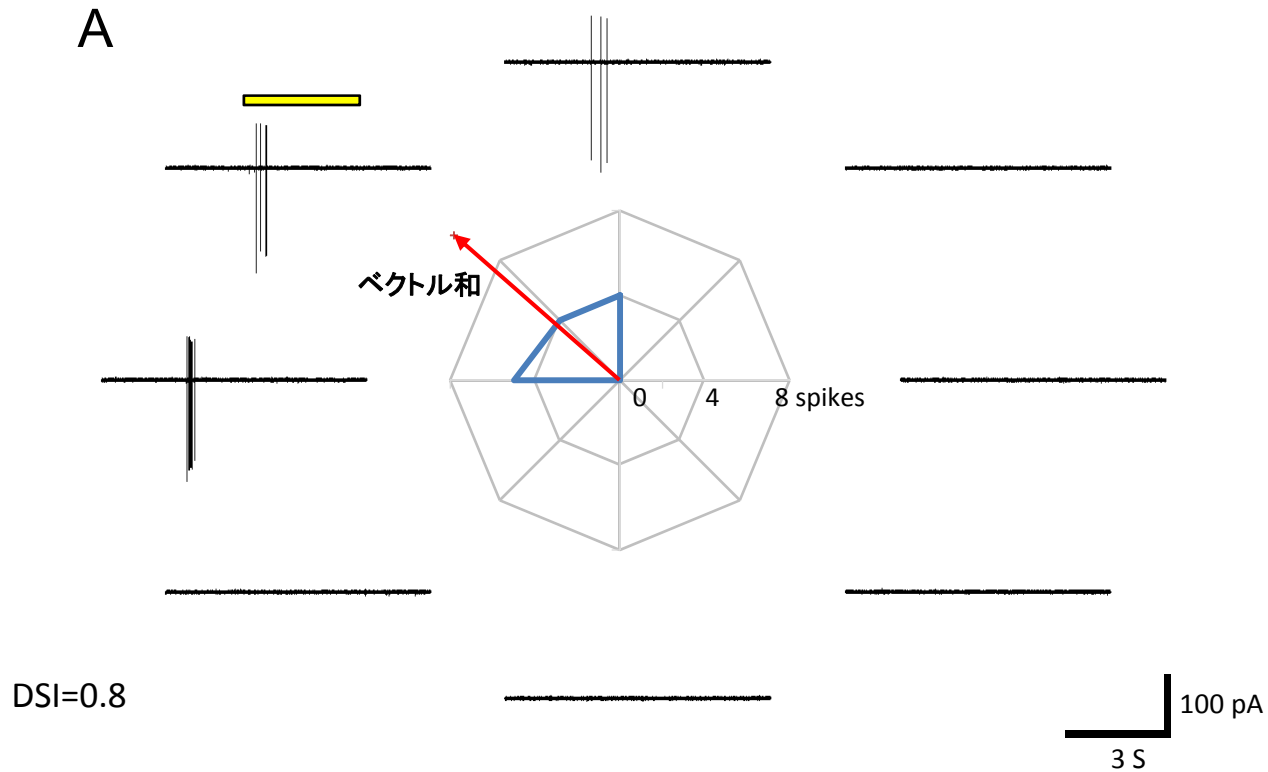
表5.1

細胞内液	分子量	mM
メタンスルホン酸セシウム ($\text{CH}_3\text{O}_3\text{SCs}$)	228	102
HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$)	238.3	20
GEDTA (EGTA) ($\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$)	380.35	5
水酸化セシウム 一水和物 ($\text{CsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	167.93	15
塩化カルシウム (CaCl_2)	110.98	0.5
塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	203.3	2.5
アデノシン 5'-三リン酸 ニナトリウム塩 (ATP) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{13}\text{P}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)	551.14	5
グアノシン5'-三リン酸三ナトリウム (GTP) ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{Na}_3\text{O}_{14}\text{P}_3$)	589.13	0.5
NEUROBIOTIN™ Tracer ($\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$)	322.8	0.2%
QX-314 ($\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}$)	343.3	5
CsOHで滴定 pH 7.4, 280 mOsm, $E_{\text{Cl}} = -58.4 \text{ mV}$		

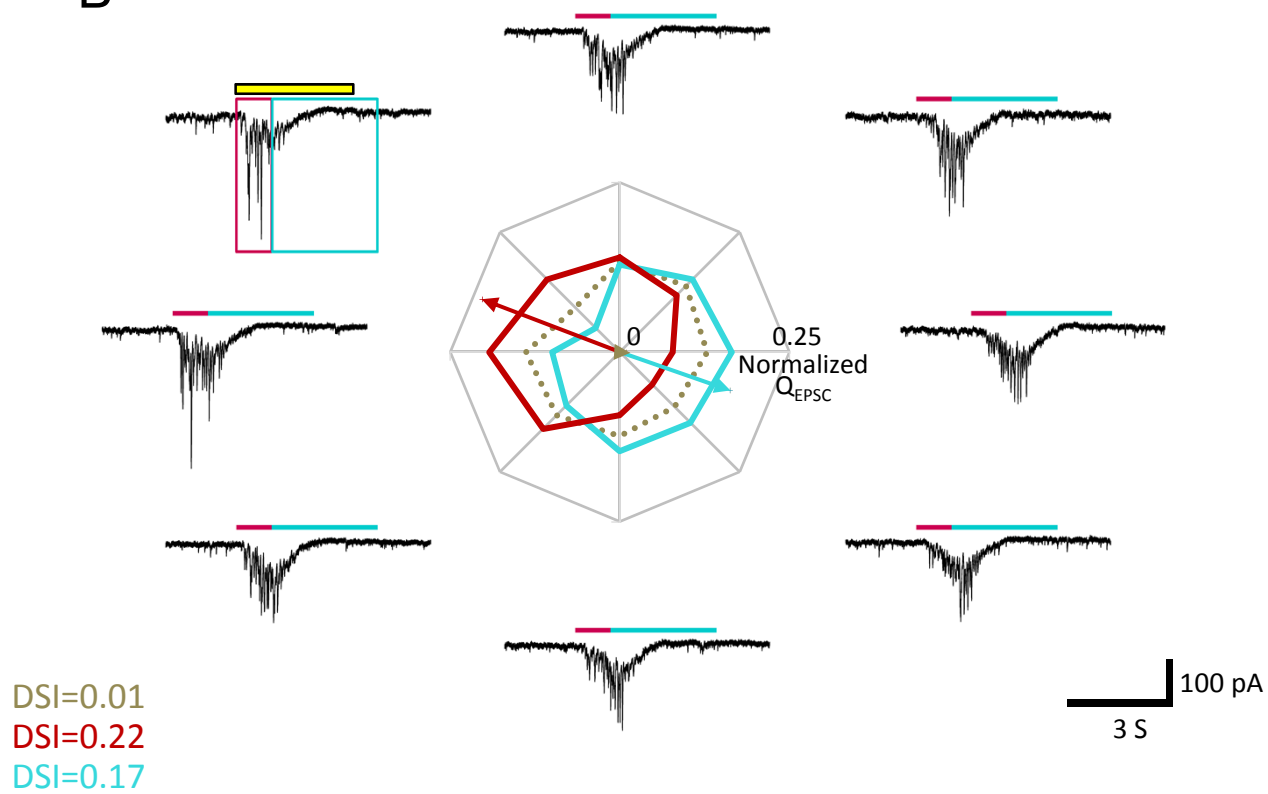
ン酸受容体や、アセチルコリン受容体は陽イオン（主にナトリウムイオンとカリウムイオン）を通すチャネルを開く。そのため、内向きに流入するナトリウムイオンと外向きに流出するカリウムイオンによってそれぞれ運ばれる正味の電流がゼロとなる反転電位はほぼ 0 mV である。これに対して、抑制性の伝達物質 (GABA、グリシン) が放出された場合は、塩素イオンを通すチャネルが開く。塩素イオンの平衡電位 (塩素イオンのみなので反転電位でもある) はこの場合おおよそ -60 mV である。したがって、興奮性電流だけ観察したい場合は、抑制性電流の反転電位である -60 mV に膜電位を固定して電流を記録し (陽イオンに対する駆動力 $[V_m - \text{反転電位}] : -60 - 0 = -60 \text{ mV}$)、抑制性電流だけ観察したい場合は、興奮性電流の反転電位である 0 mV に膜電位を固定して電流を観察 (塩素イオンに対する駆動力 $: 0 - (-60) = 60 \text{ mV}$) すればよい。

まず、興奮性の電流を観察するために、膜電位を塩素イオンの平衡電位である -60 mV に固定した (図 5.1B)。8 方向にバーを動かして電流を記録し、全時間での総電荷量 (電流の積分値) を算出してレーダープロットを作成した (図 5.1B 中央、黄土色点線)。するとベクトル和からも明らかなように運動方向選択性は観察されなかった。なお、ここではベクトルと共に DSI も表示してあるが、スパイク応答ではなく膜電流に基づく DSI であるため、運動方向選択性の有無を、スパイクで算出した DSI と同じ基準 (0.3 以上) で判断することはできない。したがってここでは、単に DSI の値の大小に注目することにする。次に膜電位を陽イオンチャネルの平衡電位である 0 mV に固定して、抑制性の電流を記録した (図 5.1C)。総電荷量でレーダープロットを作成すると、ベクトル和はスパイクで作成したベクトル和とはほぼ逆方向を指すことが分かった。スパイクのベクトル和が指す方向を選好方向、抑制性の電流のベクトル和が指す方向を非選好方向として、それぞれの方向での波形を拡大し、興奮性電流と抑制性電流を並べて表示した (図 5.2)。Cell-attached mode で記録したスパイク波形も合わせて表示すると、選好方向において、スパイクが発生している時に興奮性電流が大きく、抑制性電流が小さいことが分かった (図 5.2A)。逆に、非選好方向では、応答初期の抑制性電流が大きく、興奮性電流は少ないことが分かった (図 5.2B)。時間に対して、累積電荷量をプロットすると、選好方向では、スパイクが出ている時間では興奮性電流の累積電荷量が抑制性電流の累積電荷量

A



B



C

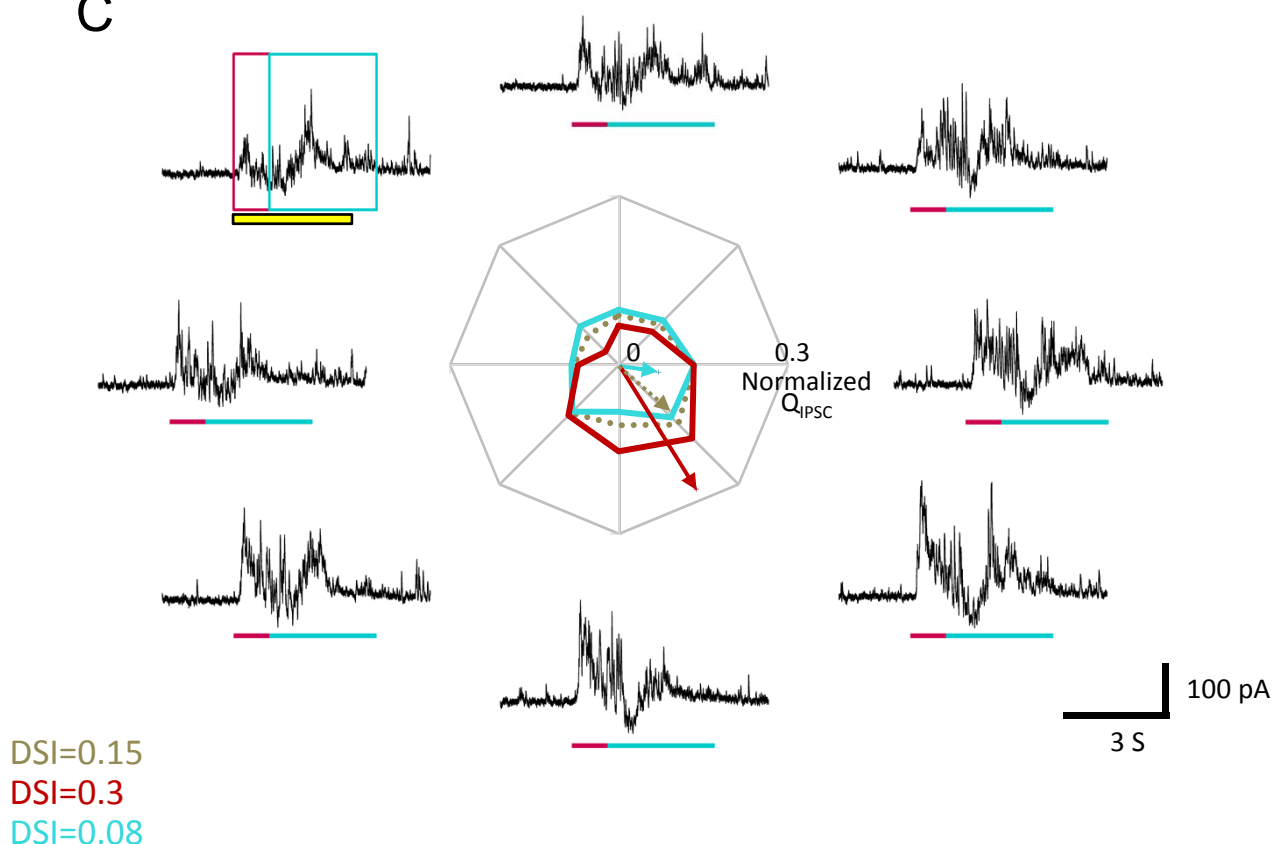


図5.1 ON型DSGCのスパイク発火とシナプス後電流

A: ON型DSGCからcell-attached modeで記録したバー刺激に対するスパイク発火。中央: 呈示された刺激の運動方向においてスパイク数をプロットしたレーダーグラフ。赤矢印はベクトル和。周辺: その運動方向刺激の呈示時に記録された電流波形。黄色バー: 刺激呈示時間。B: ON型DSGCで記録された興奮性シナプス後電流。Aと同じ細胞で、ホールセルモードに移行し、膜電位を -60 mVに保持して、バー刺激に対して生じたシナプス後電流を記録した。中央: 呈示された刺激の運動方向において電荷量(電流 \times 時間)を算出しプロットしたレーダーグラフ。刺激呈示開始から1秒間を応答初期(赤)、その後の3秒間を応答後期(水色)とし、それぞれの電荷量をプロットした。なお、電荷量は全方向の総電荷量で正規化した。黄土色は全時間のデータ。矢印: ベクトル和。色の対応は前述の通り。周辺: その運動方向刺激の呈示時に記録された膜電流波形。波形を囲んだ四角、波形の上のバーは応答初期(赤)と後期(水色)の時間を示す。黄色バー: 刺激呈示時間。C: ON型DSGCで記録された抑制性シナプス後電流。膜電位を 0 mVに保持して、バー刺激に対して生じたシナプス後電流を記録した。色の対応はBと同じ。

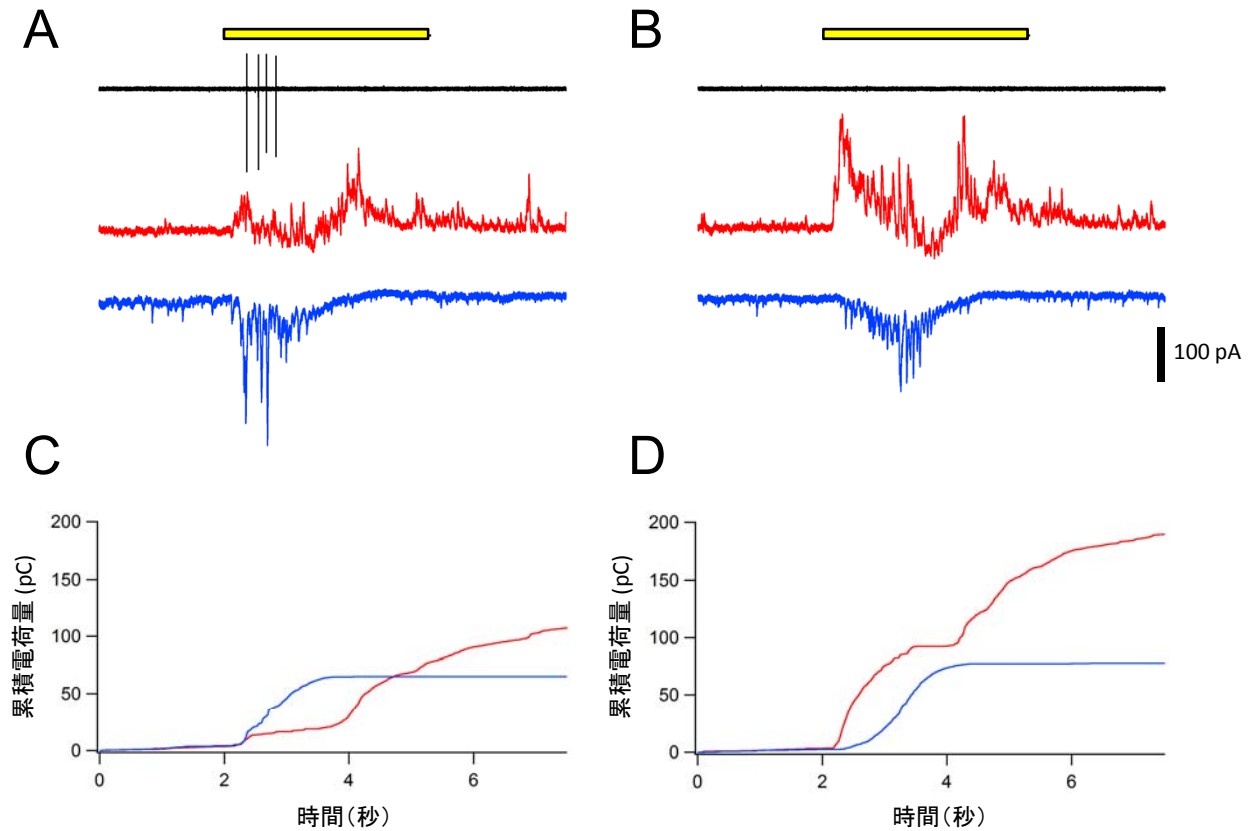


図5.2 選好方向、非選好方向におけるスパイク発火とシナプス後電流(図1と同じ細胞のデータ)

A: バー刺激が選好方向に動いた時のON型DSGCのスパイク発火(上段)、抑制性電流(赤、中段)、興奮性電流(青、下段)。黄色バー: 刺激呈示時間。B: バー刺激が非選好方向に動いた時のON型DSGCのスパイク発火(上段)、抑制性電流(赤、中段)、興奮性電流(青、下段)。黄色バー: 刺激呈示時間。C: 選好方向条件における、興奮性の累積電荷量(青)と抑制性の累積電荷量(赤)の時間変化。D: 非選好方向条件における、興奮性の累積電荷量(青)と抑制性の累積電荷量(赤)の時間変化。

を上回っていた(図 5.2C)。逆に非選好方向では、抑制性電流の累積電荷量が興奮性電流のそれを上回っていた(図 5.2D)。

では、スパイク発火が見られる時間(刺激呈示開始時刻から 1 秒間:記録開始から 2~3 秒)と、それ以降の時間(刺激呈示開始から 2~5 秒:記録開始から 3~6 秒)を分けると、運動方向選択性に違いが生じているのだろうか。前者を応答の初期相、後者を後期相と呼ぶことにすると、興奮性電流では、初期相において、電荷量のベクトル和がスパイクのベクトル和とほぼ同一の方向を指した(図 5.1B 中央、赤実線)。逆に後期相ではベクトルが逆向きになった(図 5.1B 中央、青実線)。これは、興奮性電流のピークの位置が、選好方向では応答初期に、非選好方向では応答後期にずれているためだと思われる。抑制性電流については、応答初期でより明確な運動方向選択性が観察され、ベクトル和がスパイク発火とはほぼ逆向きになった(図 5.1C 中央、赤実線)。応答後期では、運動方向選択性は観察されなかった(図 5.1C 中央、青実線)。このように、統制条件(TTX 灌流前)において、特に応答初期の抑制性入力に明確な運動方向選択性が観察された。そこで次に、この運動方向選択性が TTX の灌流投与によって変化するかどうかを検討した。

3-2 TTX の効果

TTX を灌流投与し、記録している ON 型 DSGC 以外の全ての細胞のスパイク発火を阻害したときに、ON 型 DSGC の運動方向選択性が変化するかどうかを検討した。網膜では、視細胞、双極細胞、水平細胞は基本的にはスパイクを発生させず緩電位応答をするため(Werblin & Dowling, 1969)、TTX の影響は受けない。したがって、TTX の灌流投与で主に影響を受けるのは、スパイクングアマクリン細胞と神経節細胞である。神経節細胞同士で化学シナプスを形成しているという報告はないので、ON 型 DSGC の入力に影響を与える可能性があるのはスパイクングアマクリン細胞ということになる。

まず、興奮性の電流について TTX による変化を検討してみると、応答の初期相、後期相ともに鋭く速い電流がなくなったが、ベースラインはほぼ変わらず、運動方向選択性もあまり影響を受けなかつ

た(図 5.3A, B)。これに対して、抑制性の電流は TTX で大きな影響を受けた。まず、応答の初期相では、抑制性の電流がほぼ消滅した(図 5.4A)。そして、後期相では全運動方向で抑制性の電流が増大した(図 5.4B)。後期相では、統制条件でも運動方向選択性は見られなかったが、TTX 条件でも同様に運動方向選択性は見られなかった。選好方向と非選好方向の電流波形を並べて比較したところ、統制条件における非選好方向の初期相の抑制性電流が TTX によって消失し、その結果、選好方向、非選好方向の波形の違いがなくなってしまうことが分かった(図 5.5)。累積電荷量を見ても、統制条件では応答初期相において、非選好方向で抑制性電流の累積電荷量が興奮性のそれを上回っていたのに、TTX 条件では選好方向、非選好方向両方で興奮性電流の累積電荷量が抑制性電流のそれを上回っていた。最後に選好方向、非選好方向で、TTX 投与による電荷量の増減を定量的に検討した(図 5.6)。興奮性電流に関しては選好方向、非選好方向ともに、TTX 投与による有意な変化は見られなかったが(図 5.6C, D)、抑制性電流に関しては選好方向、非選好方向ともに、応答初期相において TTX により抑制性電流が減少した(選好方向, $n = 5$ cells, 統制条件 24.9 ± 8.1 pA (平均 \pm 標準誤差), TTX 条件 3.63 ± 1.7 pA, paired t -test, $p = 0.05$; 非選好方向, $n = 5$ cells, 統制条件 104.8 ± 28.1 pA, TTX 条件 30.3 ± 18.9 pA, paired t -test, $p = 0.04$, 図 5.6A, B)。抑制性電流の応答後期相では細胞間のデータのばらつきが大きく、TTX の投与による有意な効果は見られなかった。

4. 考察

一般に、神経節細胞は、双極細胞から興奮性入力を受け、アマクリン細胞から抑制性入力を受ける(Dowling, 2012)。本実験の結果から、ON 型 DSGC では、選好方向では、スパイクが発生する時間帯において、興奮性入力が大きく、抑制性電流が小さいことが分かった。逆に非選好方向では、抑制性の入力の方が興奮性の入力よりも大きかった。このスパイクが発生する応答初期において、TTX は抑制性の入力を有意に減少させることが分かった。興奮性の入力に対しては、電荷量の比較では TTX の有意な効果は見られなかったが、振幅の大きい速い入力が消滅した。

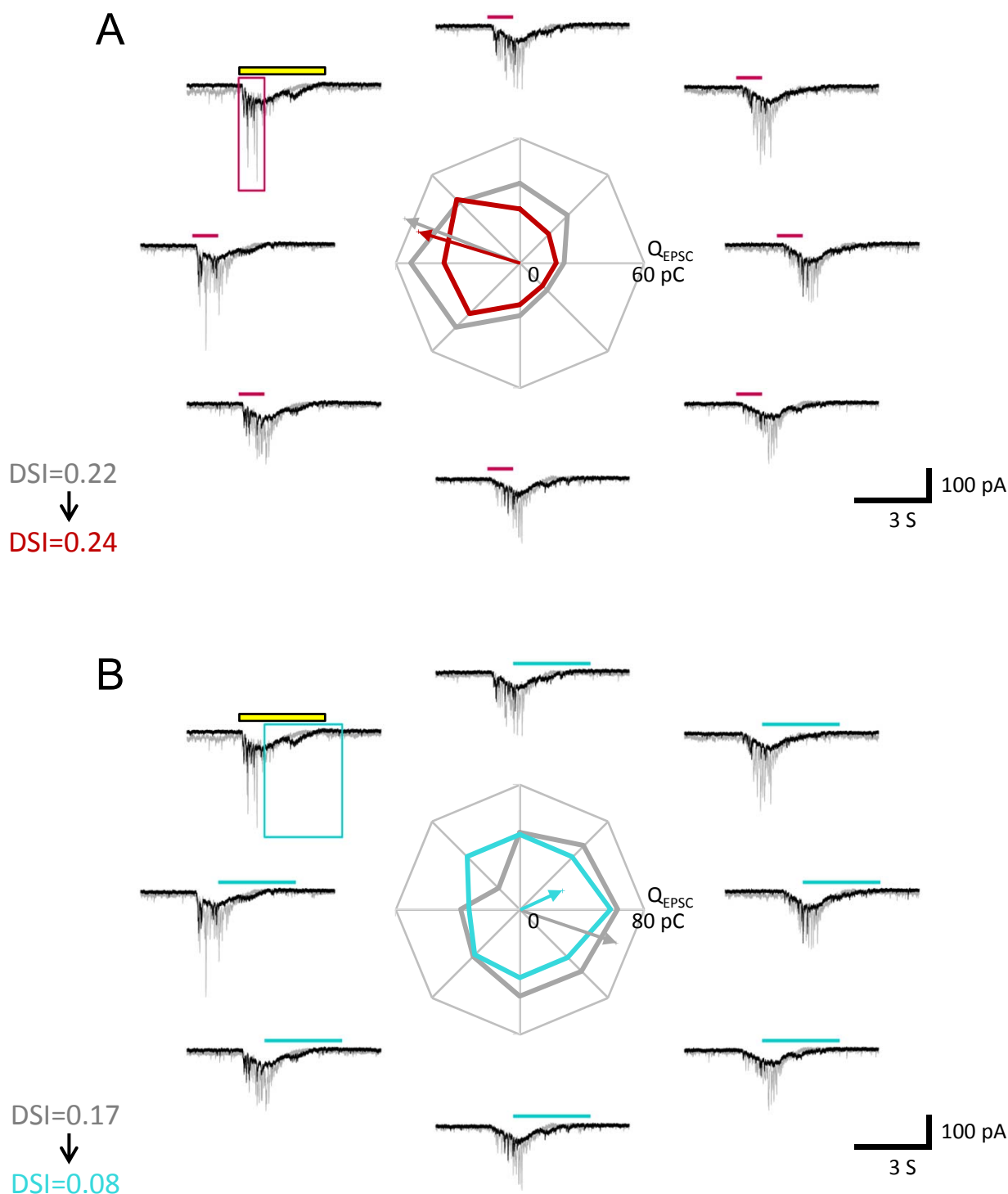


図5.3 興奮性電流に対するTTXの効果

A: 応答初期の興奮性電流におけるTTXの効果。中央: 電荷量で作成したレーダープロット。灰色: 統制条件、赤: TTX条件。矢印: ベクトル和。周辺: 各運動方向における電流波形。灰色: 統制条件、黒: TTX条件。レーダープロットの作成に使用したデータの時間を赤四角、赤バーで示す。黄色バー: 刺激呈示時間。B: 応答後期の興奮性電流におけるTTXの効果。レーダープロットの作成に使用したデータの時間を水色四角、水色バーで示す。中央: 水色: TTX条件。

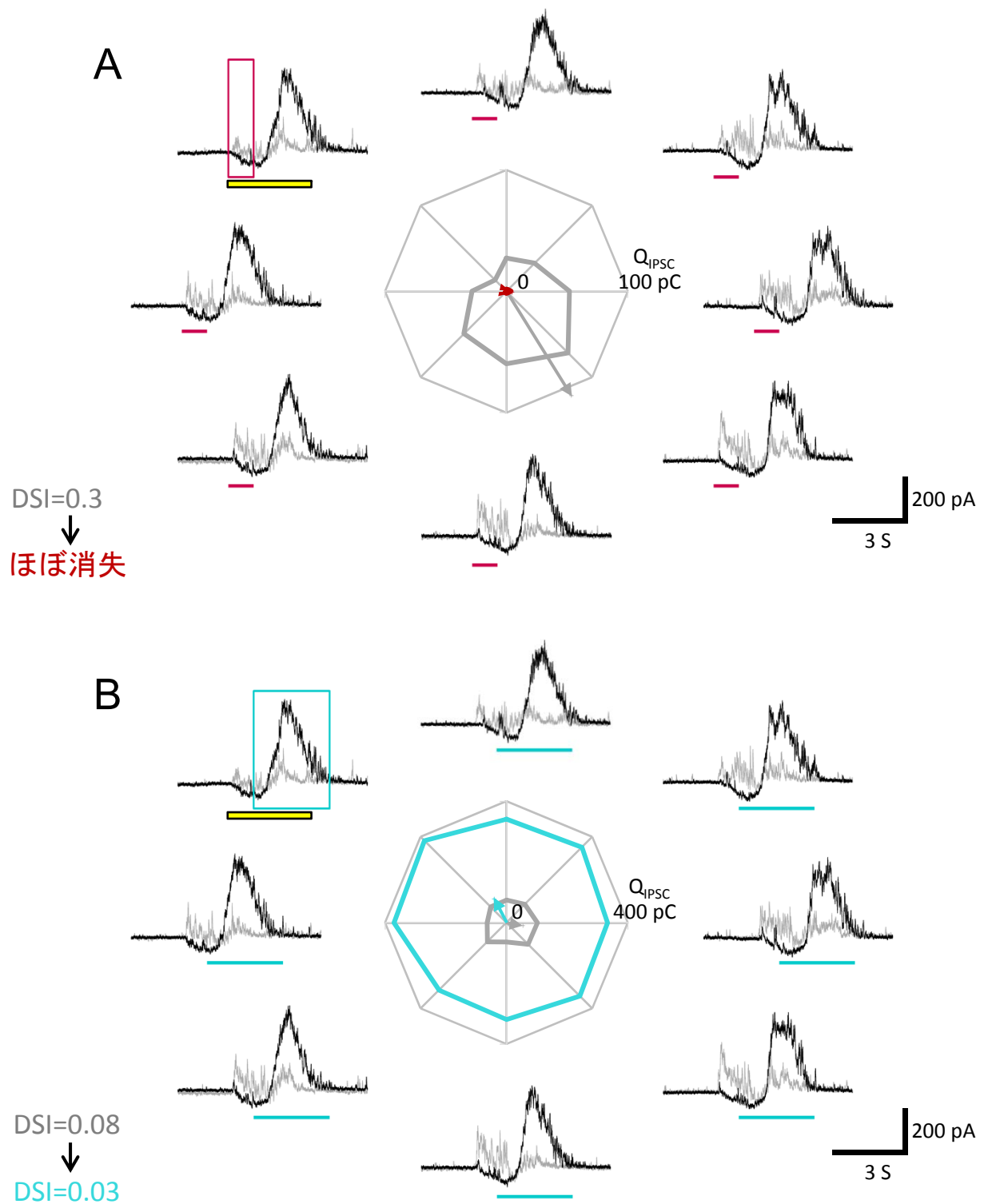


図5.4 抑制性電流に対するTTXの効果

A: 応答初期の抑制性電流におけるTTXの効果。中央: 電荷量で作成したレーダープロット。灰色: 統制条件、赤: TTX条件。矢印: ベクトル和。周辺: 各運動方向における電流波形。灰色: 統制条件、黒: TTX条件。レーダープロットの作成に使用したデータの時間を赤四角、赤バーで示す。黄色バー: 刺激呈示時間。

B: 応答後期の抑制性電流におけるTTXの効果。レーダープロットの作成に使用したデータの時間を水色四角、水色バーで示す。中央: 水色: TTX条件。

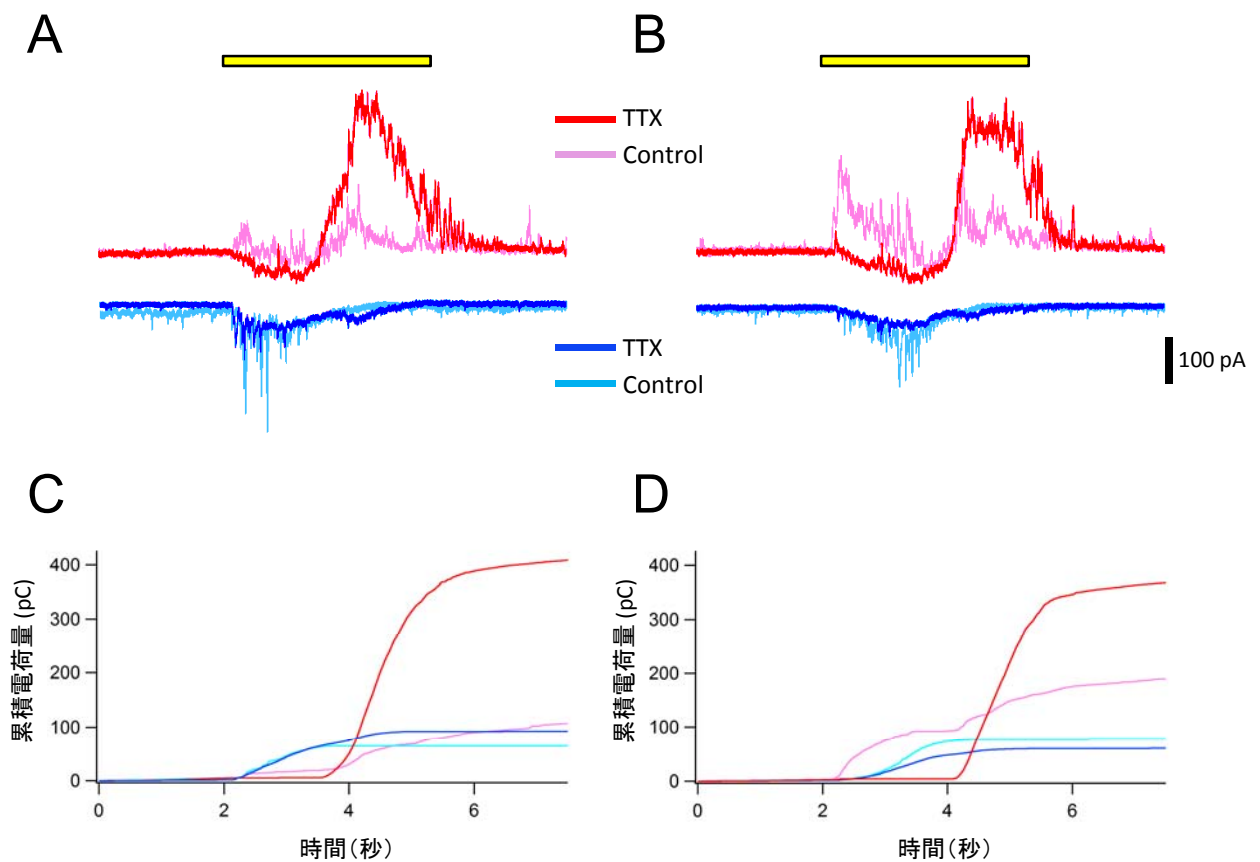


図5.5 選好方向、非選好方向におけるシナプス後電流(図5.1、5.3、5.4と同じ細胞のデータ)

A: バー刺激が選好方向に動いた時のON型DSGCの抑制性電流(上段、赤: TTX条件、ピンク: 統制条件)と興奮性電流(下段、青: TTX条件、水色: 統制条件)。黄色バー: 刺激呈示時間。B: バー刺激が非選好方向に動いた時のON型DSGCの抑制性電流(上段)、興奮性電流(下段)。その他はAに同じ。
C: 選好方向条件における、興奮性の累積電荷量(青: TTX条件、水色: 統制条件)と抑制性の累積電荷量(赤: TTX条件、ピンク: 統制条件)の時間変化。D: 非選好方向条件における、累積電荷量の時間変化。色の対応はCに同じ。

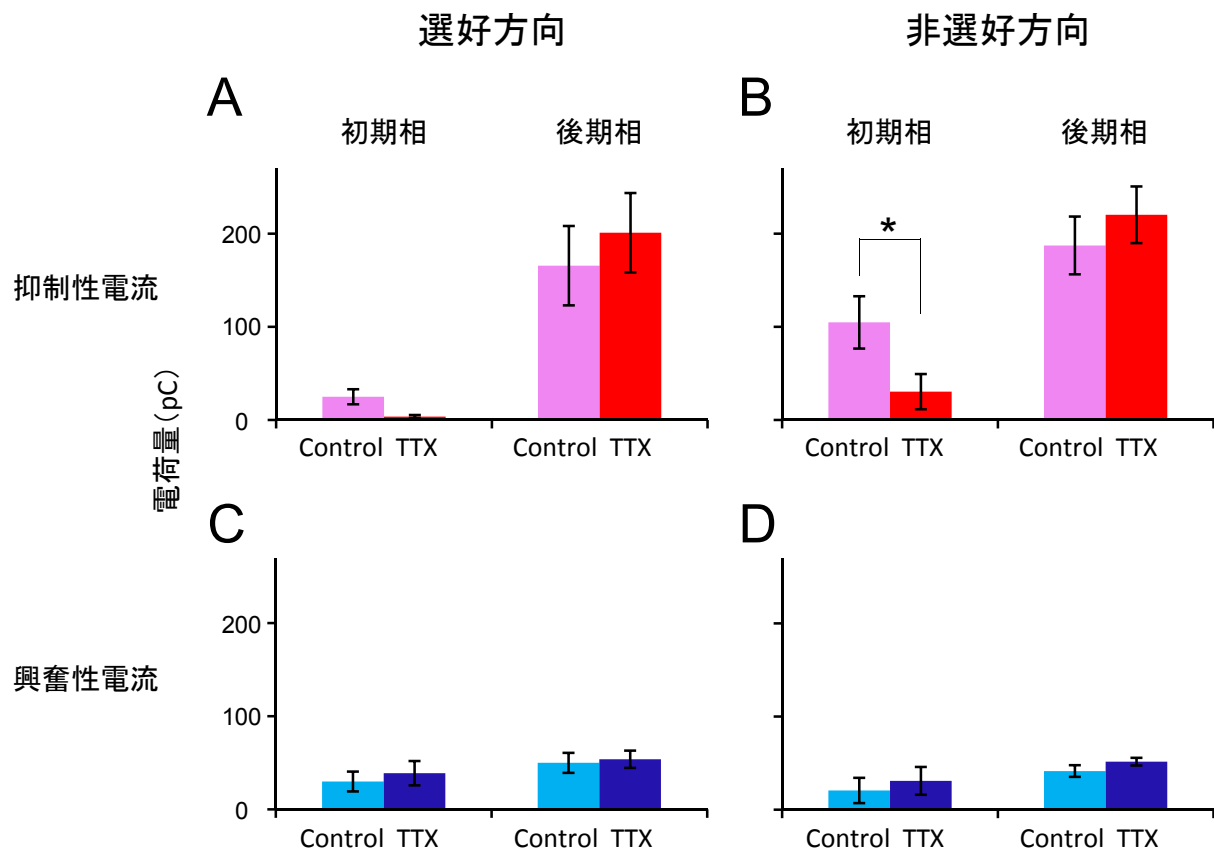


図5.6 選好方向、非選好方向における抑制性電流と興奮性電流に対してTTXが及ぼす効果

A: 選好方向における抑制性電流に対してTTXが及ぼす影響。左: 応答の初期相(刺激開始～1秒)、右: 後期相(1～4秒)。ピンク: 統制条件、赤: TTX条件。初期相において、TTXの投与により抑制性電流が減少した($n = 5$, paired t -test, $p = 0.05$)。B: 非選好方向における抑制性電流に対してTTXが及ぼす効果。初期相において、TTXの投与により抑制性電流が減少した($n = 5$, paired t -test, $p < 0.05$)。C: 選好方向における興奮性電流にTTXが及ぼす影響。応答の初期相(左)、後期相(右)ともにTTXによる有意な変化はなかった。水色: 統制条件、青: TTX条件。D: 非選好方向における興奮性電流にTTXが及ぼす影響。TTXによる有意な変化はなかった。

4-1 興奮性入力に対する TTX の効果

振幅が大きく速い興奮性の入力、TTX によって消失し、ゆっくりとした入力だけになった理由としては、いくつかの可能性が考えられる。基本的には双極細胞はスパイクを発生させず、緩電位応答を示すが、中にはスパイクを発生させるものがある。それらのうち、多くはカルシウムスパイクであるが (Burrone & Lagnado, 1997; Zenisek & Matthews, 1998; Protti *et al.*, 2000; Arai *et al.*, 2010)、ナトリウムスパイクを発生させるという報告も存在する (Ma *et al.*, 2005)。したがって、もし ON 型 DSGC がこのナトリウムスパイクを発生させる双極細胞から入力を受け取っていたとすると、TTX によって双極細胞の応答が阻害されたために、ON 型 DSGC への速く大きな興奮性入力消失した可能性がある。ON 型 DSGC がナトリウムスパイクを発生させない双極細胞からも興奮性入力を受け取っていた場合、ナトリウムスパイクを発生させる双極細胞からの入力が阻害されても、総電荷量としては有意な効果が観察されなかったのかもしれない。

もう一つの可能性は、スパイクングアマクリン細胞から双極細胞への抑制性フィードバックが阻害された結果、複数の (ナトリウムスパイクを発生しない) 双極細胞からの同期した興奮性入力消失したという可能性である。スパイクングアマクリン細胞は第 4 章で明らかになったように非常に広範囲にわたって軸索を伸ばしている。スパイクングアマクリン細胞が広範囲の双極細胞にフィードバック抑制を掛けることで、抑制がなくなった瞬間に複数の双極細胞が同期して神経節細胞へ入力を送るという可能性は十分に考えられる。そして、TTX によってスパイクングアマクリン細胞の応答が阻害されることで、双極細胞の入力が非同期で振幅の小さいものになったのかもしれない。

4-2 抑制性入力に対する TTX の効果

抑制性入力に関しては、応答の初期相と後期相で TTX の効果が異なる結果となった。まず応答の初期相では、TTX によって抑制性入力が増加した。選好方向ではもともと応答初期の入力は小さいので、差は検出しづらいが、選好方向でも、非選好方向でも抑制性の入力が増加した。これに対

して応答後期相では、TTX の有意な効果は見られなかった。TTX が応答初期相の抑制性入力だけに効果がある理由としていくつかの可能性が考えられる。

第 1 の可能性は、ON 型 DSGC への抑制性入力は応答初期と応答後期で入力を送っているアマクリン細胞が異なるという可能性である。応答初期においては TTX の効果が顕著であることから、応答初期に入力を送っているのはスパイクングアマクリン細胞で、応答後期には別のスパイクを発生させないアマクリン細胞が関わっていると考えられる。第 3 章における狂犬病ウイルスの実験では starburst amacrine cell (SAC) 以外の GABA 作動性のアマクリン細胞がウイルスに感染していた。この ON 型 DSGC とシナプス結合している GABA 作動性のアマクリン細胞がもしスパイクングアマクリン細胞であれば、TTX の効果をうまく説明することができる。さらに応答後期にはスパイクを発生させない GABA 作動性アマクリン細胞か、ほんのわずかにウイルスに感染していた SAC (スパイクを発生しない細胞) が抑制性の入力を送っている可能性が考えられる。

第 2 の可能性は、アマクリン細胞は応答初期、後期ともスパイクを発生させないアマクリン細胞が入力を送っているのだが (複数の種類が関わっているかもしれない)、そのアマクリン細胞に入力を送る双極細胞が、応答初期と後期で異なるという可能性である。応答初期には TTX により抑制性入力が増加することから、スパイクング双極細胞がアマクリン細胞を興奮させて ON 型 DSGC に抑制性入力を送り、後期にはスパイクを発生させない双極細胞がアマクリン細胞を興奮させて ON 型 DSGC に抑制性入力を送っているという考えである。

また、今回はバー刺激しか呈示していないため、応答後期の抑制性の入力が ON 経路のものなのか、OFF 経路のものなのか判断できなかった。興奮性入力は 2 相性ではないので ON 応答のみだと考えられるが、抑制性入力に関しては後期の応答は OFF 応答だと考えることもできる。そうすると、当然関わっている双極細胞の種類が異なり、ON 型双極細胞だけがスパイクを発生させるものだった可能性が十分に考えられる。しかし、双極細胞におけるナトリウム電流は、あくまでも双極細胞の応答を増強している (より速い応答を可能にする) のであって (Ma *et al.*, 2005)、TTX 条件下でも十分脱分極できるので、伝達物質の放出が止まるとは考えにくい。したがって、ON 型 DSGC への抑

制性入力の大幅な減少を説明することは難しいかもしれない。

最近、興奮性の伝達物質であるグルタミン酸を放出するアマクリン細胞 (vGluT3-expressing amacrine cells: GACs) の存在が報告された (Lee *et al.*, 2014)。この細胞はナトリウムチャネルを発現しており (Johnson *et al.*, 2004)、脱分極性の電流注入により 1 発だけナトリウムスパイクを発生させる (Grimes *et al.*, 2011)。GAC は ON-OFF 型、ON 型 DSGC とシナプス結合しており、グルタミン酸を放出している。したがって、TTX 投与条件で、ON 型 DSGC の興奮性の入力において、振幅の大きい速い成分が消失したのは、この GAC からの入力がなくなったことが原因かもしれない。また、この GAC は他の GABA 作動性アマクリン細胞ともシナプス結合している (Lee *et al.*, 2014)。したがって応答初期で、GAC から入力を受けて DSGC に抑制性の入力を送る GABA 作動性アマクリン細胞があれば、TTX により DSGC の抑制性の入力消失することになる。ただ、GAC が光応答においてスパイクを発生させるのかどうかはまだ分かっていないし、GAC からのグルタミン酸の放出にスパイク発火が必要かどうか分からない。したがって、TTX 投与条件で GAC からのグルタミン酸の放出が止まるのかも定かではない。今後さらなる検証が必要である。

第 6 章 総合考察

本論文では、ラット網膜における ON 型運動方向選択性細胞 (ON 型 DSGC) について、電気生理学的、薬理学的にその特性を調べ、またどのサブタイプのアマクリン細胞が ON 型 DSGC の運動方向選択性の形成に関与しているのかを検討した。

まず、第 2 章では、光応答特性について、ON 型 DSGC と ON-OFF 型 DSGC を比較検討した。運動方向選択性は、ON 型 DSGC は受容野よりも狭い領域 (視角約 3.3°) 内の運動に対しても維持されたが、ON-OFF 型 DSGC では視角約 8.3° 以上の領域を必要とした。また、速度依存性は、ON 型 DSGC では視角 $2^\circ \sim 32^\circ$ /秒の刺激に応答したが、ON-OFF 型 DSGC は視角 $0.5^\circ \sim 32^\circ$ /秒のより広い範囲の刺激に応答した。このように、ラット網膜での ON 型 DSGC と ON-OFF 型 DSGC の光応答特性は、ON 型 DSGC は遅い刺激に応答し、ON-OFF 型 DSGC は速い刺激に応答するというウサギ網膜での結果 (Collewijn, 1969, Oyster *et al.*, 1972; Wyatt & Daw, 1975) とは異なっていることがわかった。

ON-OFF 型 DSGC においては starburst amacrine cell (SAC) が運動方向選択性の形成に関わっているとされている (Yoshida *et al.*, 2001; Fried *et al.*, 2002)。そこで、第 3 章では、ON 型 DSGC の運動方向選択性の形成に SAC が関わっているか否かを検討するために、逆行性越シナプス性のトレーサーである狂犬病ウイルスを用い、ON 型 DSGC に入力しているアマクリン細胞を検討した。その結果、ウイルスによってラベルされた異所性アマクリン細胞の内、SAC は少数で、むしろその他の GABA 作動性アマクリン細胞が多数であることが分かった。したがって、ON 型 DSGC に主に抑制性の入力を送っているのは、SAC 以外の GABA 作動性異所性アマクリン細胞である可能性が示唆された。

第 4 章では GABA 作動性異所性アマクリン細胞について、形態と膜特性に基づいてサブタイプ分類を試みた。その結果、マウス網膜で Müller ら (2007) が分類したサブタイプ 10 種類に相当すると思われる細胞はラット網膜で 8 種類見いだすことができた。そのうち、5 種類のアマクリン細胞がス

パイクを発生させることが分かった。

そこで、第 5 章では ON 型 DSGC から運動刺激に対する光応答を記録し、アマクリン細胞のスパイク発火を TTX によって阻害した時に、運動方向選択性が変化するのかどうか検討した。その結果、TTX によって応答初期の抑制性入力が有意に減少することが分かった。

ON 型 DSGC に入力するアマクリン細胞の候補

ON 型 DSGC において、運動方向選択性はどのようにして実現されているのだろうか。ここまでの実験によって、ナトリウムスパイクを発生させる GABA 作動性異所性アマクリン細胞が ON 型 DSGC に直接抑制性の入力を送っていることが示唆された。では、どのサブタイプのアマクリン細胞なのだろうか。

まず、第 1 に、アマクリン細胞の樹状突起や軸索が広がる内網状層に着目した。ON 型 DSGC は ON 型の SAC と樹状突起の位置が重なることから、第 4 層 (3 層に近い所) に樹状突起を伸ばしている。ON 型 DSGC が抑制性のシナプス入力を樹状突起から受け取るとすると、第 4 層に樹状突起 (アマクリン細胞は樹状突起からも伝達物質を放出する)、あるいは軸索を伸ばしているアマクリン細胞が候補となる。樹状突起を第 4 層に伸ばしていたのは WA-S3 だが、これはスパイクを発生させないタイプのアマクリン細胞なので候補から外れる。その他の候補としては、Multistratified WA で、これは第 4 層を含む様々な層に樹状突起を伸ばしているタイプである。また、MA-S1/S5 は基本的には第 1 層と 5 層だが、第 4 層の方にまで樹状突起を伸ばしていたので、候補となりうる。一方、アマクリン細胞の軸索は、どのサブタイプでも第 5 層に限局されていた。しかし、第 5 層は神経節細胞層に近接した内網状層なので、直接、細胞体近傍で ON 型 DSGC とシナプスを形成することが可能だと思われる。したがって、シナプス入力部位という観点からは、軸索をもつアマクリン細胞サブタイプ全てが候補として残ることになる。

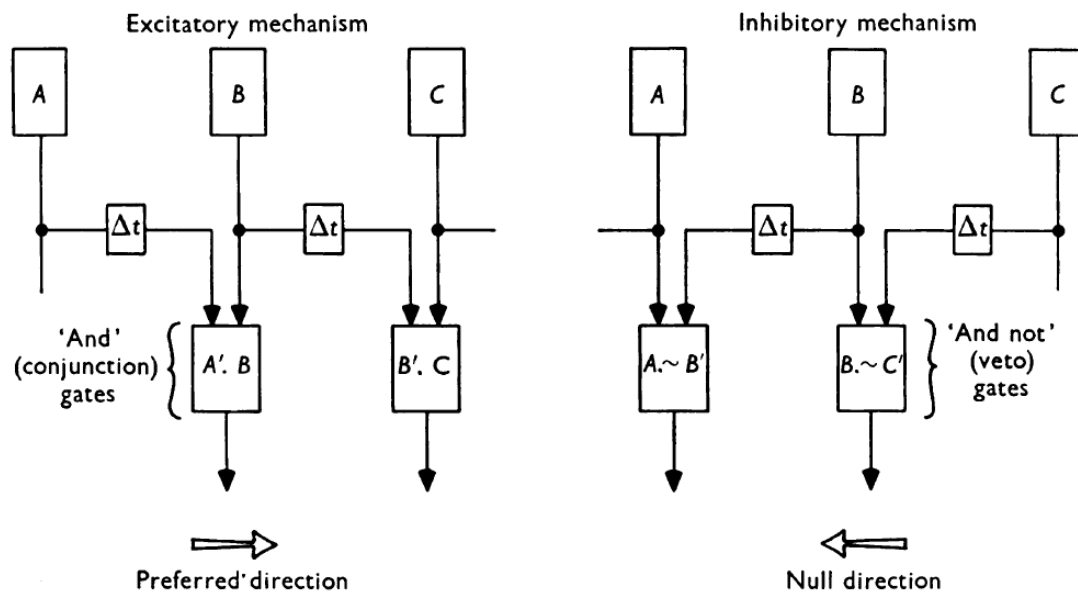
第 2 に、アマクリン細胞の受容野サイズに着目した。ON 型 DSGC は、刺激領域が小さくても運動方向選択性が維持されることから、受容野が狭いアマクリン細胞を候補として絞り込むことが可能で

ある。MA-S1/S5 は dendritic field が $300.89\ \mu\text{m}$ だったので、直径 $200\ \mu\text{m}$ くらいの刺激には十分応答できそうである。Multistratified WA も、軸索を除いた dendritic field が $332.45\ \mu\text{m}$ だったので、候補に入れられるだろう。PA-S5-1 は少し dendritic field が大きい $468.76\ \mu\text{m}$ 、PA-S5-2 も dendritic field が $283.24\ \mu\text{m}$ なので直径 $200\ \mu\text{m}$ の刺激に応答できるだろう。本研究によって ON 型 DSGC の光応答特性が明らかになったので、光刺激を用いて各アマクリン細胞サブタイプから光応答を記録し、ON 型 DSGC で運動方向選択性が観察される条件でのアマクリン細胞の応答を検討する必要があると思われるが、これは今後の課題である。

第 3 に、アマクリン細胞の樹状突起の形状と軸索の形状に着目した。ON 型 DSGC に入力する細胞は、選好方向では抑制性の入力を送らず、非選好方向では抑制性の入力を送るので、アマクリン細胞自体に運動方向選択性があるのかもしれない。一番単純なモデルは、樹状突起の形状に偏りがあるために、運動方向の違いによる応答の差異が生じるというものである。その観点から見ると、MA-S1/S5 は非常に樹状突起に偏りがある。Multistratified WA は形が複雑でよくわからないが、左右対称の形はしていない。PA-S5-1 は細胞によりばらつきが大きい。PA-S5-2 は樹状突起に大きな非対称性はないように思われる。ここで、軸索の形状を考慮してみる。いわゆるアマクリン細胞の典型的な軸索は、途中で直角に枝分かれして、縦横無尽に広がっている。これでは、特定の運動方向選択性をもつ細胞とのみ選択的に結合することは困難ではないだろうか。そうすると、Multistratified WA と PA-S1-1、PA-S1-2 は候補から外れて、MA-S1/S5 が残ることになる。

運動方向選択性のメカニズム

運動検出器のモデルとして、Barlow & Levick (1965) は二つの機構をあげている。一つは興奮性の機構で、いわゆる Reichardt-model (図 6.1 左) である。これは A の興奮性の入力時間が時間遅れ (Δt) を持っているために B の入力と同期し、そのことで応答が生じるというモデルである。しかし、このモデルでは A と B の入力と同時にこなければ、この検出器は応答しない。網膜で見つかっている ON-OFF 型 DSGC も ON 型 DSGC も静止したスポット光に対しても応答するので、このモデルは



(Barlow & Levick, 1965)

図6.1 運動検出器モデル

左: 興奮性のメカニズム。いわゆるReichardtモデル。A、Bの入力が Δt という時間遅れをもって次の段階に到達するために、B、Cの入力と同期し、'And' gateを通過することができる。右: 抑制性のメカニズム。B、Cの入力が、 Δt という時間遅れをもって、極性が逆転して次の段階に到達するため、A、Bの入力を打消し、'And not' gateを通過する。

網膜の DSGC には適用できないことになる。DSGC は非選好方向ではほとんどスパイク発火がないので、むしろ抑制性のモデル(図 6.1 右)の方が適当である。これは、非選好方向において、B からの抑制性の入力時間が時間遅れを持って A の入力と同期するので、応答が打ち消されるというモデルである。この場合には、静止した光刺激に対しては、B の位置からの抑制は興奮性の入力より遅れるので、応答することができる。したがって DSGC の特性とも合っている。では、今回候補となったアマクリン細胞が、この時間遅れのある抑制を担っているのだろうか。

ON 型 DSGC は様々な速度(視角 $2^{\circ} \sim 32^{\circ}$ /秒)の刺激に対して応答する。しかし、今回は選好方向において様々な速度の刺激を呈示しただけなので、今後、8 方向全てで様々な速度の刺激を呈示し、どの速度の時に運動方向選択性が維持されるのかを検討する必要がある。そうすることによって、 Δt がどの程度の時間なのか推定することができるだろう。

また、そもそも、なぜ Δt という時間遅れを設定しているのか考えてみると、運動刺激時にだけ効果的に働くようなモデルにするためである。したがって、もしアマクリン細胞がその性質として運動刺激に特異的に応答するものなら(つまり興奮性の Δt の仕組みを内蔵しているのかもしれない)、アマクリン細胞から神経節細胞への入力において、 Δt は必要がなくなる。ON-OFF 型 DSGC の場合は、抑制入力を送っているのは starburst amacrine cell (SAC) であると考えられている。SAC は静止したスポット光にも応答するが、細胞体のある中心から周辺への動きに対してよく応答する(Euler *et al.*, 2002; Hausselet *et al.*, 2007)。中心から周辺へ伸びた樹状突起の方向がその DSGC の非選好方向となるように、樹状突起の一部が特異的に DSGC に結合している(Briggman *et al.*, 2011)。したがって、ON-OFF 型 DSGC には、非選好方向の刺激の時だけ、その方向によく応答する複数の SAC から抑制性入力が入り、スパイク発火が抑制される。同じように ON 型についても、特定の方向の動きにだけよく応答する性質をアマクリン細胞に仮定すれば、 Δt のことは考える必要がなくなる。これを明らかにするためには、候補となっているアマクリン細胞のサブタイプの応答特性を調べる必要があるだろう。

実験結果から考えられるモデル

本研究から考えられる最も単純なモデルは以下のようなものである(図 6.2)。運動方向選択性は、アマクリン細胞(図 6.2 オレンジ)が持っていると仮定する。このアマクリン細胞は樹状突起が細胞体に対して片側にあり(図 4.3)、樹状突起側から刺激が来たときに、効率的に細胞体に興奮を伝導し、細胞体付近からスパイクを発生させ、樹状突起とは逆側に伸びた軸索によって応答初期に ON 型 DSGC に抑制性の入力を送る。逆方向から刺激が来た場合は樹状突起の部位に刺激が来るのを待たなければならない(そこに双極細胞(BC)からの入力があるから)ため、スパイクの発生が遅れ、ON 型 DSGC に効果的な抑制を掛けることができない。ON 型 DSGC への応答後期相の抑制性の入力は TTX 条件下でも存在したことから、スパイクを発生させないアマクリン細胞(図 6.2 ピンク)も入力を送っていると考えられる。ただし、TTX の影響を受けて抑制性の入力が大きくなるものがあったので、スパイクを発生させるアマクリン細胞(図 6.2 緑)によって定常的に抑制されている可能性がある。本実験結果から、スパイクを発生させないアマクリン細胞は 3 種類であった。その内、ON 型 DSGC と同じ位置に樹状突起をもつのは SAC と WA-S3 である。どちらも候補となりうるが、SAC の場合、細胞体のある中心から周辺への刺激によく応答する性質があるので、樹状突起に刺激がかかった時にすぐに応答できるアマクリン細胞(図 6.2 オレンジ)よりは応答が遅れてしまう。したがってもし、SAC が ON 型 DSGC のごく近傍にあるなら、応答後期の抑制性入力を説明することは可能かもしれない。

副視索系について

副視索とは、視交叉より尾方で、細い線維束が視索から別れたものを指す。その線維束は medial terminal nucleus (MTN)、lateral terminal nucleus (LTN)、dorsal terminal nucleus (DTN) という 3 つの核に終始している(Terubayashi & Fujisawa, 1984)。ON 型 DSGC はこの副視索系の 3 つの終止核に投射している。つまり、ON 型 DSGC の軸索は、LGN や上丘に向かう視索から別れ、副視索系の終止核という小さな核に投射しているのである。副視索系の主要な核である MTN

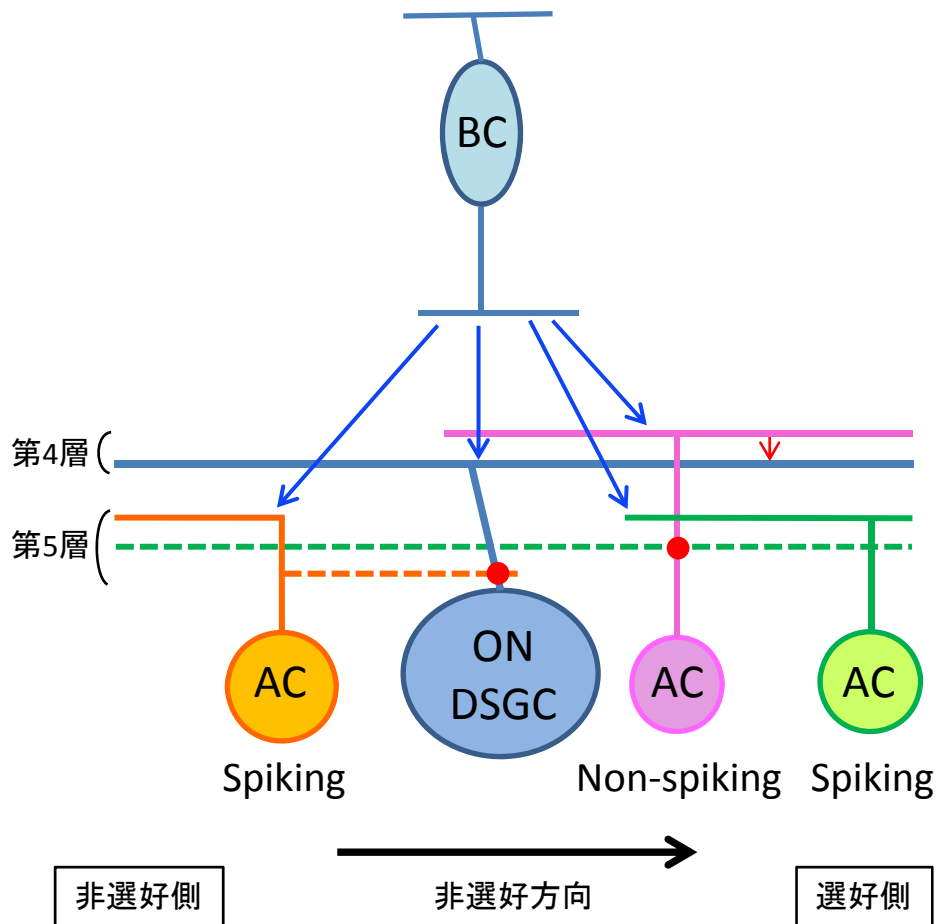


図6.2 実験結果から考えられる運動方向選択性を形成する局所神経回路網のモデル

オレンジ: 樹状突起が非選好側に偏っており、その逆側に軸索を伸ばす。非選好側から刺激が来たとき、樹状突起から細胞体へ効率的に興奮を伝導し、細胞体付近でスパイクを発生させ、ON型DSGCNを抑制する。選好側から刺激が来たときは、樹状突起に刺激が来てから応答するので、抑制が遅れる。ピンク: スパイクを発生させないアマクリン細胞。ON型DSGCにおける応答後期の抑制を担っている。TTX投与により抑制が増加する場合があることから、普段は緑のアマクリン細胞(スパイクを発生させる)によって抑制されている。

実線: 樹状突起、点線: アマクリン細胞の軸索。赤丸: アマクリン細胞の軸索と神経細胞のシナプス結合部位。アマクリン細胞の軸索は第5層に存在するため、第5層に樹状突起を広げていない神経細胞とシナプス結合する場合、細胞体か、細胞体付近の樹状突起でシナプスを形成することになる。

の第一の投射先は、同側の DTN と nucleus of optic tract (NOT) である。NOT は DTN と隣接する視蓋前野の核で、DTN と同様に水平方向の運動に対する選択性を持っている。一方、MTN は垂直方向の運動に対する選択性を持っており、MTN と DTN/NOT は互いに抑制し合うことが知られている (Van der Togt *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1998)。MTN の第 2 の投射先は、後交連を通じて対側の腹側中脳被蓋領域であり、この経路の途中で副動眼神経核のカハール間質核やダルクシェビッツ核にも投射する。第 3 の投射先は同側の中脳網様体や吻側橋網様核、中脳水道周囲灰白質である。第 4 の投射先は、対側の前庭神経核群と橋底部の外背側部である。第 5 の投射先は、同側の下オリーブ核であり、対側の下オリーブ核にもわずかに投射する (Giolli *et al.*, 1984)。第 4 の投射先である前庭神経核群は、前庭神経の投射先であり、平衡感覚の情報を受け取り、脊髄、眼筋を制御している神経核や小脳等へ投射し、体の平衡と姿勢の維持や眼球運動に関与している。下オリーブ核からは登上線維が小脳のプルキンエ細胞にシナプス結合し興奮性の入力を与えるが、この小脳の部位も姿勢の保持や身体の平衡調節に関与している。これらのことから、副視索系は眼球運動や前庭動眼反射に関与することが予想される。

サルで、NOT と DTN を破壊すると、暗闇において破壊した部位と対側方向への自発的な眼振 (緩徐相) が生じ、同側方向への視覚刺激に対する眼振が障害を受ける。また視運動性眼振だけではなく、追跡眼球運動も障害を受け、眼球運動の速度が遅くなってしまうのを補うためにサッケードの回数が増加する (Ilg *et al.*, 1993)。また、複雑な相互作用があるためか、垂直方向に選択性をもつ LTN、MTN の破壊によって、水平方向の眼球運動が障害を受けることも報告されている。暗闇では破壊側への自発的な眼振が生じ、反対側への視運動性眼振が障害を受ける。動物が乗ったターンテーブルを回すことによって生じる前庭動眼反射も、破壊側への回転に対する反射が大きく障害を受ける (Clément & Magnin, 1984)。これらのことから、副視索系が視運動性眼振や前庭動眼反射、さらに追跡眼球運動にも関わっていることが示唆されている。

上丘との比較

ON-OFF 型運動方向選択性細胞が LGN や上丘に投射するのに対して、ON 型 DSGC は副視索系の核に投射する。上丘もサッケード等の眼球運動に関与することが知られており、ある対象に対して、目や頭、体を向ける反応 (orienting response) を担うとされている。上丘が様々な感覚入力を統合し、また様々な高次皮質の影響を受けるのに対して (Corneil & Munoz, 2014)、副視索系の場合は、主たる入力は網膜からのものであり、ネコ、サルを除いては皮質からの入力は見つかっていない。腹側 LGN からの入力を受けるが、その他は出力先の核と相互結合しているだけである (Giolli *et al.*, 1988; Giolli *et al.*, 2006)。したがって副視索系は ON 型 DSGC からの入力を統合し、他の核と相互作用して選択性を高め、眼球運動の指令を送る核に出力するというシンプルな役割を担っていると思われる。副視索系が関与する眼球運動は恐らく、視野を安定させるために、ON 型 DSGC によって検知された運動を打ち消すように眼球を動かすというものだろう。頭や体が動いた場合は視野全体が動き、それを打ち消すように眼球を動かすのが前庭動眼反射である。視運動性眼振を引き起こすような大きな刺激の運動に対しても、それを打ち消すように眼球を動かせば、刺激に眼球が追従するいわゆる視運動性眼振の緩徐相となる。追跡眼球運動については副視索系が関わっているという報告は少ないが、あるオブジェクトの動きを ON 型 DSGC が検知し、動きを打ち消すように眼球を動かせば、オブジェクトを追従することになるのだろう。

ON型DSGCの役割

視野を安定させる目的にしても、刺激を遅れなく追従する目的にしても、ON 型 DSGC はわずかな動きに対しても素早く応答する必要がある。樹状突起が ON-OFF 型 DSGC と比較して大型であるにも関わらず、受容野内の小さな領域の運動に運動方向選択的に応答できる性質を持つことは、理に適っているといえるだろう。また、運動方向を形成するためにアマクリン細胞がスパイクを用いていることも、素早く運動方向選択的に応答するために必要なことなのかもしれない。ON 型 DSGC は細胞体付近でスパイクを発生させる前に、光刺激が樹状突起の領域に入った時に、樹状突起で小

さなスパイクを発生させ、それが細胞体付近でのスパイク発火を引き起こすことが報告されている (Sivyer & Williams, 2013)。緩電位よりもスパイクの方が素早く確実に細胞体まで到達するので、細胞体付近で樹状突起からの入力を加算してスパイクを発生させるよりも素早く応答することができる。逆に、非選好方向ではこの樹状突起のスパイクを打ち消さなければならないため、非選好方向で抑制性の入力を送るアマクリン細胞がスパイクを発生させるのであれば理に適っているといえる。また ON-OFF 型 DSGC は全て光刺激に対して一過性であるが、ウサギでは ON 型 DSGC は一過性のものと持続性のものがあると報告されている (Hoshi *et al.*, 2011; Kanjhan & Sivyer, 2010)。持続型が存在するということは、運動の始まりだけではなく、運動の持続時間も符号化できる可能性があり、より正確な眼球運動の制御が可能になると考えられる。

今後の展望

本研究では、どのサブタイプのアマクリン細胞が運動方向選択性を形成する抑制性の入力を送っているのか同定することはできなかった。候補となったサブタイプのアマクリン細胞からの記録はこれまで1細胞しか成功しておらず、これを探して光応答を記録するのは至難の業かもしれない。しかし今回の研究により、候補となったアマクリン細胞 (MA-S1/S5) は、短い軸索様のプロセスしか持っていないので、ON 型 DSGC の細胞体のごく近傍に存在する細胞であると思われる。そうすると、候補が絞られるので、狙って記録することが可能になるかもしれない。そもそも、ON 型 DSGC から記録すること自体が大変困難であるため、今後は動物をマウスに変えて、予め遺伝子操作により ON 型 DSGC がラベルされた動物 (Dhande *et al.*, 2013) を使うなど、記録の効率化を図る必要もあるだろう。

今現在、SAC が ON 型 DSGC についても運動方向選択性を形成しているという考え方が主流である。しかし、ON 型 DSGC が視野を安定させるために運動を素早く検出するという役割に特化したものであると考えれば、ON-OFF 型とは異なるメカニズムが採用されている可能性は十分に考えられる。本研究からも、狂犬病ウイルスによるトレーサーの実験と、TTX による薬理学的実験という 2

点から SAC は主役ではないという論拠が得られている。SAC 以外のアマクリン細胞のサブタイプが真の主役であることを証明するには、さらに ON 型 DSGC と候補のアマクリン細胞サブタイプからの同時記録を行い、運動方向選択性の形成に関与していることを積極的に示す必要があるだろう。

謝辞

東京大学大学院人文社会系研究科の立花政夫教授には、長年に渡り、研究計画の立案から電気生理実験の実施およびデータ分析、論文の執筆に至るまで、筆舌に尽くしがたい多大なるご指導を頂きました。また、京都大学霊長類研究所の高田昌彦教授には、当時在籍されていた東京都神経科学総合研究所において狂犬病ウイルスを注入する実験の機会を頂き、解剖学について指導して頂きました。免疫染色については同研究所において今西美知子、南(黒田)呈子の両氏に多大なる援助をして頂きました。東京都医学総合研究所の岡戸晴生副参事には、共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞形態の観察について指導して頂きました。本研究について、大学院研究会等において東京大学大学院人文社会系研究科心理学研究室の佐藤隆夫教授、高野陽太郎教授、横澤一彦教授、村上郁也准教授から大変有用なコメントを頂きました。また、東京大学大学院理学系研究科の岡良隆教授には、審査会において多くの大変貴重なコメントを頂きました。

本論文第2章の実験は当時学部4年生だった赤松翼さんの尽力によって成立したものであり、第4章の実験は修士課程の大学院生であった松嶋優さんで行いました。また、博士課程の大学院生である松本彰弘さんには立花教授の退官に伴う研究室の撤退作業を始め、様々な苦しい局面で研究生生活を支えて頂きました。専修大学の石金浩史准教授には、折に触れ有用なアドバイスを頂き、また生活を支えて頂きました。その他立花研究室の多くの優秀な先輩、同僚、後輩に支えられて、有意義な研究生生活を送ることができました。これまでお世話になった皆様に、心から感謝の意を表します。

引用文献

- Ackert, J.M., Wu, S.H., Lee, J.C., Abrams, J., Hu, E.H., Perlman, I., & Bloomfield, S. a (2006) Light-induced changes in spike synchronization between coupled ON direction selective ganglion cells in the mammalian retina. *J. Neurosci.*, **26**, 4206–4215.
- Amthor, F. & Oyster, C. (1995) Spatial organization of retinal information about the direction of image motion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 4002–4005.
- Amthor, F.R., Oyster, C.W., & Takahashi, E.S. (1984) Morphology of on-off direction-selective ganglion cells in the rabbit retina. *Brain Res.*, **298**, 187–190.
- Arai, I., Tanaka, M., & Tachibana, M. (2010) Active roles of electrically coupled bipolar cell network in the adult retina. *J. Neurosci.*, **30**, 9260–9270.
- Ariel, M. & Daw, N.W. (1982) Pharmacological analysis of directionally sensitive rabbit retinal ganglion cells. *J. Physiol.*, **324**, 161–185.
- Baccus, S. a, Olveczky, B.P., Manu, M., & Meister, M. (2008) A retinal circuit that computes object motion. *J. Neurosci.*, **28**, 6807–6817.
- Badea, T.C. & Nathans, J. (2004) Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *J. Comp. Neurol.*, **480**, 331–351.
- Bader, C., Bertrand, D., & Schwartz, E. (1982) Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina. *J. Physiol.*, **331**, 253–284.
- Barlow, H. (1953) Summation and inhibition in the frog's retina. *J. Physiol.*, **119**, 69–88.
- Barlow, H.B. & Hill, R.M. (1963) Selective sensitivity to direction of movement in ganglion cells of the rabbit retina. *Science (80-)*, **139**, 412–414.
- Barlow, H.B., Hill, R.M., & Levick, W.R. (1964) Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit. *J. Physiol. Paris*, **173**, 377–407.

- Barlow, H.B. & Levick, W.R. (1965) The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. *J. Physiol.*, **178**, 477–504.
- Bastianelli, E., Takamatsu, K., Okazaki, K., Hidaka, H., & Pochet, R. (1995) Hippocalcin in rat retina. Comparison with calbindin-D28k, calretinin and neurocalcin. *Exp. Eye Res.*, **60**, 257–266.
- Boos, R., Schneider, H., & Wässle, H. (1993) Voltage- and Transmitter-gated Currents Slice Preparation of the Rat Retina of All-Amacrine Cells in a. *J. Neurosci.*, **13**, 2874–2888.
- Brainard, D.H. (1997) The Psychophysics Toolbox. *Spat. Vis.*, **10**, 433–436.
- Briggman, K.L., Helmstaedter, M., & Denk, W. (2011) Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature*, **471**, 183–188.
- Buhl, E.H. & Peichl, L. (1986) Morphology of rabbit retinal ganglion cells projecting to the medial terminal nucleus of the accessory optic system. *J. Comp. Neurol.*, **253**, 163–174.
- Burrone, J. & Lagnado, L. (1997) Electrical resonance and Ca²⁺ influx in the synaptic terminal of depolarizing bipolar cells from the Goldfish retina. *J. Physiol.*, **505**, 571–584.
- Caldwell, J., Daw, N., & Wyattt, H. (1978) Effects of picrotoxin and strychnine on rabbit retinal ganglion cells: lateral interactions for cells with more complex receptive fields. *J. Physiol.*, **276**, 277–298.
- Chiao, C.-C. & Masland, R.H. (2003) Contextual tuning of direction-selective retinal ganglion cells. *Nat. Neurosci.*, **6**, 1251–1252.
- Clément, G. & Magnin, M. (1984) Effects of accessory optic system lesions on vestibulo-ocular and optokinetic reflexes in the cat. *Exp. brain Res.*, **55**, 49–59.
- Collewijn, H. (1969) Optokinetic eye movements in the rabbit: input-output relations. *Vision Res.*, **9**, 117–132.
- Corneil, B.D. & Munoz, D.P. (2014) Overt responses during covert orienting. *Neuron*, **82**, 1230–1243.

- Dann, J.F. & Buhl, E.H. (1987a) Retinal ganglion cells projecting to the accessory optic system in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **262**, 141–158.
- Dann, J.F. & Buhl, E.H. (1987b) Retinal Ganglion Cells Projecting to the Accessory Optic System in the Rat. *J. Comp. Neurol.*, **262**, 141–158.
- DeVries, S.H. & Schwartz, E.A. (1999) Kainate receptors mediate synaptic transmission between cones and ‘Off’ bipolar cells in a mammalian retina. *Nature*, **397**, 157–160.
- Dhande, O.S., Estevez, M.E., Quattrochi, L.E., El-Danaf, R.N., Nguyen, P.L., Berson, D.M., & Huberman, A.D. (2013) Genetic dissection of retinal inputs to brainstem nuclei controlling image stabilization. *J. Neurosci.*, **33**, 17797–17813.
- Dowling, J. (2012) *The Retina*. The Belknap press of Harvard University Press, Massachusetts and London.
- Euler, T., Detwiler, P.B., & Denk, W. (2002) Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells. *Nature*, **418**, 845–852.
- Fain, G. & Dowling, J. (1973) Intracellular recordings from single rods and cones in the mudpuppy retina. *Science (80-)*, **180**, 1178–1181.
- Famiglietti, E.J., Kaneko, A., & Tachibana, M. (1977) Neuronal Architecture of On and Off Pathways to Ganglion Cells in Carp Retina. *Science (80-)*, **198**, 1267–1269.
- Famiglietti, E.J. & Kolb, H. (1976) Structural basis for ON- and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science (80-)*, **194**, 193–195.
- Famiglietti, E. V (1983) “Starburst” amacrine cells and cholinergic neurons: mirror-symmetric on and off amacrine cells of rabbit retina. *Brain Res.*, **261**, 138–144.
- Famiglietti, E. V (1992a) Polyaxonal Amacrine Cells of Rabbit Retina : Morphology and Stratification of PA1 Cells. *J. Comp. Neurol.*, **316**, 391–405.
- Famiglietti, E. V (1992b) Polyaxonal amacrine cells of rabbit retina: PA2, PA3, and PA4 cells. Light and electron microscopic studies with a functional interpretation. *J. Comp. Neurol.*, **316**, 422–446.

- Famiglietti, E. V (1992c) Polyaxonal amacrine cells of rabbit retina: size and distribution of PA1 cells. *J. Comp. Neurol.*, **316**, 406–421.
- Fried, S.I., Münch, T.A., & Werblin, F.S. (2002) Mechanisms and circuitry underlying directional selectivity in the retina. *Nature*, **420**, 411–414.
- Gábel, R. & Witkovsky, P. (1998) Cholinergic, but not the rod pathway-related glycinergic (AII), amacrine cells contain calretinin in the rat retina. *Neurosci. Lett.*, **247**, 179–182.
- Giolli, R. a, Blanks, R.H., & Torigoe, Y. (1984) Pretectal and brain stem projections of the medial terminal nucleus of the accessory optic system of the rabbit and rat as studied by anterograde and retrograde neuronal tracing methods. *J. Comp. Neurol.*, **227**, 228–251.
- Giolli, R. a, Blanks, R.H.I., & Lui, F. (2006) The accessory optic system: basic organization with an update on connectivity, neurochemistry, and function. *Prog. Brain Res.*, **151**, 407–440.
- Giolli, R. a, Torigoe, Y., & Blanks, R.H. (1988) Nonretinal projections to the medial terminal accessory optic nucleus in rabbit and rat: a retrograde and anterograde transport study. *J. Comp. Neurol.*, **269**, 73–86.
- Graf, W., Simpson, J., & Leonard, C. (1988) Spatial Organization of Visual Messages of the Rabbit's Cerebellar Flocculus. II. Complex and Simple Spike Responses of Purkinje Cells. *J. Neurophysiol.*, **60**, 2091–2121.
- Greschner, M., Field, G.D., Li, P.H., Schiff, M.L., Gauthier, J.L., Ahn, D., Sher, A., Litke, A.M., & Chichilnisky, E.J. (2014) A polyaxonal amacrine cell population in the primate retina. *J. Neurosci.*, **34**, 3597–3606.
- Grimes, W.N., Seal, R.P., Oesch, N., Edwards, R.H., & Diamond, J.S. (2011) Genetic targeting and physiological features of VGLUT3+ amacrine cells. *Vis. Neurosci.*, **28**, 381–392.
- Hamano, K., Kiyama, H., Emson, P.C., Manabe, R., Nakauchi, M., & Tohyama, M. (1990) Localization of two calcium binding proteins, calbindin (28 kD) and parvalbumin (12 kD), in the vertebrate retina. *J. Comp. Neurol.*, **424**, 417–424.

- Hartline, H. (1938) The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *Am. J. Physiol.*, **121**, 400–415.
- Hausselet, S.E., Euler, T., Detwiler, P.B., & Denk, W. (2007) A dendrite-autonomous mechanism for direction selectivity in retinal starburst amacrine cells. *PLoS Biol.*, **5**, e185.
- He, S. & Levick, W.R. (2000) Spatial-temporal response characteristics of the ON-OFF direction selective ganglion cells in the rabbit retina. *Neurosci. Lett.*, **285**, 25–28.
- He, S. & Masland, R.H. (1997) Retinal direction selectivity after targeted laser ablation of starburst amacrine cells. *Nature*, **389**, 378–382.
- He, S. & Masland, R.H. (1998) ON direction-selective ganglion cells in the rabbit retina: dendritic morphology and pattern of fasciculation. *Vis. Neurosci.*, **15**, 369–375.
- Hirata, Y., Miyachi, S., Inoue, K. -i., Ninomiya, T., Takahara, D., Hoshi, E., & Takada, M. (2013) Dorsal Area 46 Is a Major Target of Disynaptic Projections From the Medial Temporal Lobe. *Cereb. Cortex*, **23**, 2965–2975.
- Hoshi, H., Tian, L.-M., Massey, S.C., & Mills, S.L. (2011) Two distinct types of ON directionally selective ganglion cells in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, **519**, 2509–2521.
- Hubel, D. & Wiesel, T. (1959) Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J. Physiol.*, **148**, 574–591.
- Hubel, D. & Wiesel, T. (1960) Receptive fields of optic nerve fibres in the spider monkey. *J. Physiol.*, **154**, 572–580.
- Hubel, D.H. (1959) Single unit activity in striate cortex of unrestrained cats. *J. Physiol.*, **147**, 226–238.
- Hubel, D.H. & Wiesel, T.N. (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol.*, **160**, 106–154.
- Ilg, U.J., Bremmer, F., & Hoffmann, K. (1993) Optokinetic and pursuit system : a case report. *Behav. Brain Res.*, **57**, 21–29.

- Inoue, S., Sato, Y., Hasegawa, H., Noguchi, A., Yamada, A., Kurata, T., & Iwasaki, T. (2003) Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific antirabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. *Pathol. Int.*, **53**, 525–533.
- Ito, M. (2013a) Error detection and representation in the olivo-cerebellar system. *Front. Neural Circuits*, **7**, 1.
- Ito, M. (2013b) Error detection and representation in the olivo-cerebellar system. *Front. Neural Circuits*, **7**, 1–8.
- Johnson, J., Sherry, D.M., Liu, X., Fremeau, R.T., Seal, R.P., Edwards, R.H., & Copenhagen, D.R. (2004) Vesicular glutamate transporter 3 expression identifies glutamatergic amacrine cells in the rodent retina. *J. Comp. Neurol.*, **477**, 386–398.
- Kaneko, A. (1970) Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. *J. Physiol.*, **207**, 623–633.
- Kaneko, A. & Tachibana, M. (1985) A voltage-clamp analysis of membrane currents in solitary bipolar cells dissociated from *Carassius auratus*. *J. Physiol.*, **358**, 131–152.
- Kanjhan, R. & Sivyer, B. (2010) Two types of ON direction-selective ganglion cells in rabbit retina. *Neurosci. Lett.*, **483**, 105–109.
- Kawaguchi, Y. & Kubota, Y. (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex*, **7**, 476–486.
- Kay, J.N., De la Huerta, I., Kim, I.-J., Zhang, Y., Yamagata, M., Chu, M.W., Meister, M., & Sanes, J.R. (2011) Retinal ganglion cells with distinct directional preferences differ in molecular identity, structure, and central projections. *J. Neurosci.*, **31**, 7753–7762.
- Kelly, R.M. & Strick, P.L. (2000) Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J. Neurosci. Methods*, **103**, 63–71.
- Koike, C., Obara, T., Uriu, Y., Numata, T., Sanuki, R., Miyata, K., Koyasu, T., Ueno, S., Funabiki, K., Tani, A., Ueda, H., Kondo, M., Mori, Y., Tachibana, M., & Furukawa, T. (2010) TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 332–337.

- Kuffler, S. (1953) Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J. Neurophysiol.*, **16**, 37–68.
- Lee, S., Chen, L., Chen, M., Ye, M., Seal, R.P., & Zhou, Z.J. (2014) An Unconventional Glutamatergic Circuit in the Retina Formed by vGluT3 Amacrine Cells. *Neuron*, **84**, 708–715.
- Lee, S., Kim, K., & Zhou, Z.J. (2010) Role of ACh-GABA cotransmission in detecting image motion and motion direction. *Neuron*, **68**, 1159–1172.
- Lettvin, J., Maturana, H., McCulloch, W., & Pitts, W. (1959) What the frog's eye tells the frog's brain. *Proc. IRE*, **47**, 1940–1951.
- Lin, B. & Masland, R.H. (2006) Populations of wide-field amacrine cells in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.*, **499**, 797–809.
- Lu, X., Miyachi, S., & Takada, M. (2012) Anatomical evidence for the involvement of medial cerebellar output from the interpositus nuclei in cognitive functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 18980–18984.
- Ma, Y., Cui, J., & Pan, Z. (2005) Heterogeneous expression of voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels in mammalian retinal bipolar cells. *Vis. Neurosci.*, **22**, 119–133.
- Masland, R. & Ames, A. 3rd. (1976) Responses to acetylcholine of ganglion cells in an isolated mammalian retina. *J. Neurophysiol.*, **39**, 1220–1235.
- Masland, R., Mills, J., & Hayden, S. (1984) Acetylcholine-synthesizing amacrine cells: identification and selective staining by using radioautography and fluorescent markers. *Proc. R. Soc. London B*, **223**, 79–100.
- Masland, R.H. & Mills, J.W. (1979) Autoradiographic identification of acetylcholine in the rabbit retina. *J. Cell Biol.*, **83**, 159–178.
- Matsumoto, N. & Naka, K. (1972) Identification of intracellular responses in the frog retina. *Brain Res.*, **42**, 59–71.
- Maturana, H. & Frenk, S. (1963) Directional Movement and Horizontal Edge Detectors in the Pigeon Retina. *Science (80-)*, **142**.

- May, C.A., Nakamura, K., Fujiyama, F., & Yanagawa, Y. (2008) Quantification and characterization of GABA-ergic amacrine cells in the retina of GAD67-GFP knock-in mice. *Acta Ophthalmol.*, **86**, 395–400.
- Miyachi, S., Hirata, Y., Inoue, K.I., Lu, X., Nambu, A., & Takada, M. (2013) Multisynaptic projections from the ventrolateral prefrontal cortex to hand and mouth representations of the monkey primary motor cortex. *Neurosci. Res.*, **76**, 141–149.
- Miyachi, S., Lu, X., Inoue, S., Iwasaki, T., Koike, S., Nambu, A., & Takada, M. (2005) Organization of multisynaptic inputs from prefrontal cortex to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of rabies virus. *J. Neurosci.*, **25**, 2547–2556.
- Müller, L.P.D.S., Shelley, J., & Weiler, R. (2007) Displaced amacrine cells of the mouse retina. *J. Comp. Neurol.*, **505**, 177–189.
- Naka, K. & Otsuka, T. (1975) Morphological and functional identifications of catfish retinal neurons. II. Morphological identification. *J. Neurophysiol.*, **38**, 72–91.
- Nakajima, Y., Iwakabe, H., Akazawa, C., Naka, H., Shigemoto, R., Mizno, N., & Nakanishi, S. (1993) Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11868–11873.
- Nelson, R., Famiglietti, E.J., & Kolb, H. (1978) Intracellular Staining Reveals Different Levels of Stratification for On- and Off-Center Ganglion Cells in Cat Retina. *J. Neurophysiol.*, **41**, 472–483.
- Ninomiya, T., Sawamura, H., Inoue, K.I., & Takada, M. (2012) Multisynaptic Inputs from the Medial Temporal Lobe to V4 in Macaques. *PLoS One*, **7**, 8–13.
- Nirenberg, S. & Meister, M. (1997) The Light Response of Retinal Ganglion Cells Is Truncated by a Displaced Amacrine Circuit. *Neuron*, **18**, 637–650.
- O'Malley, D., Sandell, J., & Masland, R. (1992) Co-release of acetylcholine and GABA by the starburst amacrine cells. *J. Neurosci.*, **12**, 1394–1408.

- O'Malley, D.M. & Masland, R.H. (1989) Co-release of acetylcholine and gamma-aminobutyric acid by a retinal neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 3414–3418.
- Oyster, C.W. (1968) The analysis of image motion by the rabbit retina. *J. Physiol.*, **199**, 613–635.
- Oyster, C.W. & Barlow, H.B. (1967) Direction-selective units in rabbit retina: distribution of preferred directions. *Science*, **155**, 841–842.
- Oyster, C.W., Takahashi, E., & Collewijn, H. (1972) Direction-selective retinal ganglion cells and control of optokinetic nystagmus in the rabbit. *Vision Res.*, **12**, 183–193.
- Pan, Z. (2000) Differential expression of high- and two types of low-voltage-activated calcium currents in rod and cone bipolar cells of the rat retina. *J. Neurophysiol.*, **83**, 513–527.
- Pan, Z. & Hu, H. (2000) Voltage-dependent Na(+) currents in mammalian retinal cone bipolar cells. *J. Neurophysiol.*, **84**, 2564–2571.
- Pelli, D.G. (1997) The VideoToolbox software for visual psychophysics: transforming numbers into movies. *Spat. Vis.*, **10**, 437–442.
- Perry, V.H. & Walker, M. (1980a) Amacrine cells, displaced amacrine cells and interplexiform cells in the retina of the rat. *Proc. R. Soc. London B*, **208**, 415–431.
- Perry, V.H. & Walker, M. (1980b) Amacrine cells, displaced amacrine cells and interplexiform cells in the retina of the rat. *Proc. R. Soc. London B*, **208**, 415–431.
- Polyak, S.L. (1941) *The Retina*. Univ. Chicago Press., Chicago.
- Protti, D.A., Flores-herr, N., & Gersdorff, H. Von (2000) Light Evokes Ca²⁺ Spikes in the Axon Terminal of a Retinal Bipolar Cell. *Neuron*, **25**, 215–227.
- Ramón y Cajal, S. (1972) *The Structure of the Retina*. Charles C. Thomas, Illinois.
- Schmidt, M., Tögt, C. Van Der, Wahle, P., & Hoffmann, K. (1998) Characterization of a directional selective inhibitory input from the medial terminal nucleus to the pretectal nuclear complex in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 1533–1543.

- Schwartz, E. (1974) Responses of bipolar cells in the retina of the turtle. *J. Physiol.*, **236**, 211–224.
- Shingai, R. & Christensen, B.N. (1983) Sodium and calcium currents measured in isolated catfish horizontal cells under voltage clamp. *Neuroscience*, **10**, 893–897.
- Simpson, J.I. (1984) The accessory optic system. *Annu. Rev. Neurosci.*, **7**, 13–41.
- Sivyer, B. & Williams, S.R. (2013) Direction selectivity is computed by active dendritic integration in retinal ganglion cells. *Nat. Neurosci.*, **16**, 1848–1856.
- Slaughter, M. & Miller, R. (1983) An excitatory amino acid antagonist blocks cone input to sign-conserving second-order retinal neurons. *Science (80-.)*, **219**, 1230–1232.
- Stasheff, S.F. & Masland, R.H. (2002) Functional Inhibition in Direction-Selective Retinal Ganglion Cells : Spatiotemporal Extent and Intralaminar Interactions. *J. Neurophysiol.*, **88**, 1026–1039.
- Strack, A.M., Sawyer, W.B., Platt, K.B., & Loewy, A.D. (1989) CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. *Brain Res.*, **491**, 274–296.
- Sun, W., Deng, Q., Levick, W.R., & He, S. (2006) ON direction-selective ganglion cells in the mouse retina. *J. Physiol.*, **576**, 197–202.
- Tachibana, M. (1981) Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. *J. Physiol.*, **321**, 141–161.
- Tachibana, M. (1983) Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. *J. Physiol.*, **345**, 329–351.
- Tamalu, F. & Watanabe, S.-I. (2007) Glutamatergic input is coded by spike frequency at the soma and proximal dendrite of AII amacrine cells in the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.*, **25**, 3243–3252.
- Tauchi, M. & Masland, R. (1984) The shape and arrangement of the cholinergic neurons in the rabbit retina. *Proc. R. Soc. London B*, **223**, 101–119.

- Terubayashi, H. & Fujisawa, H. (1984) The accessory optic system of rodents: a whole-mount HRP study. *J. Comp. Neurol.*, **227**, 285–295.
- Tomita, T., Kaneko, A., Murakami, M., & Pautler, E. (1967) Spectral response curves of single cones in the carp. *Vision Res.*, **7**, 519–531.
- Uematsu, M., Hirai, Y., Karube, F., Ebihara, S., Kato, M., Abe, K., Obata, K., Yoshida, S., Hirabayashi, M., Yanagawa, Y., & Kawaguchi, Y. (2008) Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic venus-expressing rats. *Cereb. Cortex*, **18**, 315–330.
- Ugolini, G. (1992) Transneuronal transfer of herpes simplex virus type 1 (HSV 1) from mixed limb nerves to the CNS. I. Sequence of transfer from sensory, motor, and sympathetic nerve fibres to the spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, **326**, 527–548.
- Ugolini, G. (1995) Specificity of rabies virus as a transneuronal tracer of motor networks: transfer from hypoglossal motoneurons to connected second-order and higher order central nervous system cell groups. *J. Comp. Neurol.*, **356**, 457–480.
- Van der Togt, C., Cardozo, B.N., & Van der Want, J. (1991) Medial terminal nucleus terminals in the nucleus of the optic tract contain GABA: An electron microscopical study with immunocytochemical double labeling of GABA and PHA-L. *J. Comp. Neurol.*, **312**, 231–241.
- Vaney, D.I., Sivyer, B., & Taylor, W.R. (2012) Direction selectivity in the retina: symmetry and asymmetry in structure and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 194–208.
- Vaney, I. (1994) Territorial Organization of Direction-Selective Ganglion Cells in Rabbit Retina. *J. Neurosci.*, **14**, 6301–6316.
- Veruki, M.L. & Hartveit, E. (2002a) AII (Rod) Amacrine Cells Form a Network of Electrically Coupled Interneurons in the Mammalian Retina. *Neuron*, **33**, 935–946.
- Veruki, M.L. & Hartveit, E. (2002b) Electrical Synapses Mediate Signal Transmission in the Rod Pathway of the Mammalian Retina. *J. Neurosci.*, **22**, 10558–10566.
- Volgyi, B., Xin, D., Amarillo, Y., & Bloomfield, S.A. (2001) Morphology and physiology of the polyaxonal amacrine cells in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, **440**, 109–125.

- Wagner, H., Macnichol, E., & Wolbarsht, M. (1960a) The Response Properties of Single Ganglion Cells in the Goldfish Retina. *J. Gen. Physiol.*, **43**, 45–62.
- Wagner, H., Macnichol, E.J., & Wolbarsht, M. (1960b) Opponent Color Responses in Retinal Ganglion Cells. *Science (80-.)*, **131**, 1314.
- Wässle, H., Grünert, U., & Röhrenbeck, J. (1993) Immunocytochemical staining of AII-amacrine cells in the rat retina with antibodies against parvalbumin. *J. Comp. Neurol.*, **332**, 407–420.
- Werblin, F. & Dowling, J. (1969) Organization of the retina of the Mudpuppy, *Necturus maculosus*: II. Intracellular recording. *J. Neurophysiol.*, **32**, 339–355.
- Wyatt, H.J. & Daw, N.W. (1975) Directionally sensitive ganglion cells in the rabbit retina: specificity for stimulus direction , size , and speed. *J. Neurophysiol.*, **38**, 613–626.
- Yonehara, K., Balint, K., Noda, M., Nagel, G., Bamberg, E., & Roska, B. (2011) Spatially asymmetric reorganization of inhibition establishes a motion-sensitive circuit. *Nature*, **469**, 407–410.
- Yonehara, K., Farrow, K., Ghanem, A., Hillier, D., Balint, K., Teixeira, M., Jüttner, J., Noda, M., Neve, R.L., Conzelmann, K.-K., & Roska, B. (2013) The first stage of cardinal direction selectivity is localized to the dendrites of retinal ganglion cells. *Neuron*, **79**, 1078–1085.
- Yonehara, K., Ishikane, H., Sakuta, H., Shintani, T., Nakamura-Yonehara, K., Kamiiji, N.L., Usui, S., & Noda, M. (2009) Identification of retinal ganglion cells and their projections involved in central transmission of information about upward and downward image motion. *PLoS One*, **4**, e4320.
- Yonehara, K., Shintani, T., Suzuki, R., Sakuta, H., Takeuchi, Y., Nakamura-Yonehara, K., & Noda, M. (2008) Expression of SPIG1 reveals development of a retinal ganglion cell subtype projecting to the medial terminal nucleus in the mouse. *PLoS One*, **3**, e1533.
- Yoshida, K., Watanabe, D., Ishikane, H., Tachibana, M., Pastan, I., & Nakanishi, S. (2001) A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement. *Neuron*, **30**, 771–780.

Zenisek, D. & Matthews, G. (1998) Calcium action potentials in retinal bipolar neurons. *Vis. Neurosci.*, **15**, 69–75.