膜イオン電流に基づく単離網膜水平細胞応答の再構成

正員 白井 支朗 (豊橋技科大)

非会員 池野 英利 (豊橋技科大)

1. ま え が き

網膜はそれに写る外界像(網膜像)を空間並列的に前処理し、集約・圧縮した情報を神経インパルスとして脳に伝えるという工学的にも非常に興味深い優れた機能を持っている。その変換プロセスは、複雑かつ高度であり、従来より主に形態学、電気生理学の分野において研究が進められている。

さて、網膜は形態学的には視細胞、水平細胞、双極細胞、内網状層細胞、アマクリン細胞および神経節細胞がそれぞれ層構造を成しており⁽¹⁾、光信号としての画像情報はこれらの細胞層を通過することにより、神経インパルスへ変換される。これらの細胞の特性は、ガラス微小電極を細胞内に刺入し、光照射や薬物に対する各細胞の細胞内応答電位の測定から明らかにされてきているが、網膜内では細胞どうしが化学的あるいは電気的に結合しており、単独の細胞の特性はわからなかった。

しかしながら、最近になり網膜水平細胞、双極細胞などについて、これらを単離、培養し、そのイオン電流の測定が行われ、数々の新しい知見が得られている⁽²⁾⁻⁽⁴⁾。ここでは、これらの知見を基に単離水平細胞にみられる各イオン電流をホジキンとハクスリー⁽⁵⁾(以下 H-H と略す)と同様な数学モデルで記述し、さらに、このイオン電流モデルに基づき単離水平細胞応答の再構成を行った。

なお、これらのモデルのパラメータ決定、およびシミュレーションには、会話型連続系シミュレータ: SIGMA⁽⁶⁾を用いた。

2. 細胞膜とイオン電流

一般に細胞の電気的特性は、細胞内部と外液間のイオン濃度差および各種イオンが細胞膜を通過することにより生じるイオン電流によって決まる⁽⁷⁾。すなわち、膜の内外のイオン濃度差により、イオンを移動させる起電力(driving force)が生じる。また、細胞膜には、種類によって透過率が異なるイオンの通路、いわゆるイオン選択性を持つチャネルが存在し、このチャネルにおけるイオンの移動が、イオン電流として観測される。イオン透過率の電位依存特性や薬理学的性質はチャネルによって異なり、膜電位を変えたり、薬物を作用させることによって特定のイオンだけを通過できないようにすることも可能である。なお、こうしたイオン電流の特性は、通常、細胞内電位を一定の値に固定(Voltage clamp)したときに流れる電流を測定することによって実験的に求められる。

3. 単離水平細胞のイオン電流モデル

Tachibana⁽²⁾は、キンギョ網膜水平細胞を単離培養した後、Voltage clamp 法によりそのイオン電流の特性を測定した。図1は、得られた水平細胞の電流特性である。図1(a)からわかるように、固定する電位によって電流の大きさ、時間特性は大きく変化している。図1(b)はクランプ電圧印加後0.2秒および5.3秒における電流-電圧特性($I-V$ 特性)であるが、約 -60 mV より過分極側では著しい内向きの整流特性を持ち、脱分極側では時変特性が見られる。次に、細胞にさまざまな薬物を作用させたり、外液のイオン濃度を変えるなどの方法により、目的以外の電流をブロックし、以下のイオン電流が分離・抽出され、その特性が測定された。

I_{Ca} (Calcium current)

I_A (Transient outward K current)

Reconstruction of Solitary Horizontal Cell Responses with Membrane Ionic Currents. By Shiro Usui, Member & Hidetoshi Ikeno, Non-member (Toyohashi University of Technology).

白井支朗: 会 員, 豊橋技術科学大学情報工学科

池野英利: 非会員, 現在, 舞鶴工業高等専門学校電気工学科

(a) 電流波形 (固定電圧: $c_1 = -66$, $c_2 = -39$, $c_3 = -19$ mV)
(b) I - V 特性 (クランプ後 0.2, 5.3 秒における特性, 点線は漏れ電流成分)

図 1 単離水平細胞の Voltage clamp 応答特性⁽²⁾

Fig. 1. Voltage clamp responses of solitary horizontal cell.

I_{Ka} (Anomalous rectifying K current)

I_{Kv} (Delayed rectifying K current)

I_{glu} (Glutamate sensitive current)

さらに、これらイオン電流をすべてブロックすると図 1 (b) の点線の成分が残る。この成分は静止電位付近で極性が反転し、電位にほぼ比例して増加することから、漏れ電流成分 I_l と考えられる。なお、図 1 (a) の e1, e2 はこの漏れ電流成分の波形である。図 1 の複雑な I - V 特性は、これら電流成分の総和として得られるものである。次節では、これら各電流成分のモデル化について述べる。また、最近では Na 電流の存在も実験的に明らかにされたが⁽⁸⁾、この成分はクランプ後急速に不活性化することからここでは無視した。

(3・1) I_{Ca} のモデル I_{Ca} の I - V 特性は、約 -40 mV から脱分極側で活性化し、 $+10$ mV で最大、それより脱分極側で減少するベル形の特性を持ち、膜電位が一定であるにもかかわらず、電流は指数関数的に減少(不活性化)する。この不活性化は、細胞内 Ca^{2+} イオンの蓄積によるものであることが実験的に示されている⁽²⁾。

さて、 I_{Ca} については他の細胞でも調べられており、Llinás ら⁽⁹⁾は Squid Giant Synapse のカルシウム電流を測定し、そのモデル化を行った。彼らのモデルではチャンネルあたりに流れる電流 (driving force に相当する) は、脱分極側に向かうにつれて小さくなり、チャンネルが開く確率 (コンダクタンスに相当する) は逆に過分極側へいくほど小さくなる特性を持つとした。そして、 I_{Ca} のベル型の I - V 特性は、この 2 つの成分が積として働いた結果であると考えた。水平細胞に見られる I_{Ca} についても彼らのモデルと同様に、次に示す driving force: E_{Ca} とコンダクタンス: g_{Ca} の積の形で表現した。

まず、driving force は、逆 S 字型の I - V 特性を記述するため Llinás のモデルと同様に次式を用いた。

$$E_{Ca} = -\frac{1}{1 + \exp((V - 30)/8)} \quad \dots\dots\dots (1)$$

次に g_{Ca} の特性は、その Dynamics も含めて記述するため、以下のように H - H 型の式で表した*。

$$\alpha m_{Ca} = \frac{5(80 - V)}{\exp((80 - V)/28) - 1} \quad \dots\dots\dots (2)$$

$$\beta m_{Ca} = 2 \exp(-V/15) \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$\frac{dm_{Ca}}{dt} = \alpha m_{Ca}(1 - m_{Ca}) - \beta m_{Ca} m_{Ca} \quad \dots\dots\dots (4)$$

前述のように I_{Ca} は、細胞内部の Ca^{2+} イオンの蓄積により減少する。細胞内に流れ込む Ca 電流は、やや遅れて細胞内の Ca^{2+} イオン濃度に影響すると考えられることから、次式のようにパラメータ h_{Ca} に対し I_{Ca} は一次遅れ系を通して働くとした。

$$h_{Ca} = \frac{S_0 - S_{Ca}}{S_0} \quad \dots\dots\dots (5)$$

$$S_{Ca} = \int \exp(-0.05(t - \tau)) I_{Ca}(t) dt \quad \dots\dots\dots (6)$$

$$S_0 = 250$$

ここで、式 (6) で表される S_{Ca} は、細胞内イオン濃度に対応する変数であり、 S_0 は S_{Ca} の最大値を表す。

以上より、 g_{Ca} は

$$g_{Ca} = h_{Ca} m_{Ca}^4 \quad \dots\dots\dots (7)$$

$$\bar{g}_{Ca} = 150 \text{ (nS)}$$

と表され、 I_{Ca} は E_{Ca} と g_{Ca} の積の形で次式のように記述される。

$$I_{Ca} = -g_{Ca} E_{Ca} \quad \dots\dots\dots (8)$$

*: すなわち、 H - H モデルと同様に m は膜電位変化に伴う電流活性化の時間特性を、 h は不活性化の特性を表すパラメータである。 α, β はこれらパラメータの電位依存特性を決めるもので、その定常値は $\alpha/(\alpha + \beta)$ である。以下、他の電流成分についても同様である。

(a) 電流波形 ($V = -20, 10, 40 \text{ mV}$)
(b) $I-V$ 特性

図2 I_{Ca} モデルのシミュレーション結果
Fig. 2. Simulation results of I_{Ca} model.

ここで、 g_{Ca} のパラメータ m_{Ca} の乗数は、モデルの立ち上がりの特性およびピーク振幅の電位依存特性を実験データと比較し、最もよく近似する4乗を選んだ。

I_{Ca} モデルについて、膜電位を一定に固定したときの特性を、シミュレーションにより求めた結果、図2(a)に示すように電位依存でしかも時間的に変化する特性が再現された。また、図2(b)は電流のピーク振幅の膜電位依存特性である。

〈3・2〉 I_A のモデル I_A は立ち上がりの時定数が小さく、膜電位を一定に固定した直後に流れ始めるが、一定電圧に固定しておくとき、時間的に振幅は減少していく。また、この電流のピーク振幅は、クランプする前に保持されていた電圧（ホールド電圧）およびクランプ電圧に依存する。このような特性は、 $H-H$ の Na 電流で見られ、ここでは彼らの記述に従って、2つのパラメータ m_A, h_A により定式化した。

まず、その時間的な変化が非常に速いことから、立ち上がり部分の動特性は省略し定常特性のみをモデル化した。すなわち、

$$\alpha_{m_A} = \frac{40(80 - V)}{\text{EXP}[(80 - V)/15] - 1} \quad (9)$$

$$\beta_{m_A} = 8 \text{EXP}[-V/20] \quad (10)$$

$$m_A = \frac{\alpha_{m_A}(V)}{\alpha_{m_A}(V) + \beta_{m_A}(V)} \quad (11)$$

である。

また、ホールド電圧に対する特性は、 $H-H$ の Na

(a) 電流波形 ($V = -20, 0, 20 \text{ mV}$)
(b) $I-V$ 特性

図3 I_A モデルのシミュレーション結果
Fig. 3. Simulation results of I_A model.

電流の記述と同様に、次の h_A パラメータにより表した。

$$\alpha_{h_A} = 0.01 \text{EXP}[-V/20] \quad (12)$$

$$\beta_{h_A} = \frac{2}{\text{EXP}[-(30 + V)/8] + 1} \quad (13)$$

$$\frac{dh_A}{dt} = \alpha_{h_A}(1 - h_A) - \beta_{h_A}h_A \quad (14)$$

これより、 g_A および I_A は、

$$g_A = m_A h_A^2 \bar{g}_A \quad (15)$$

$$I_A = g_A(V - E_K) \quad (16)$$

$$E_K = -30 \text{ (mV)}$$

$$\bar{g}_A = 3 \text{ (nS)}$$

と表すことができる。

この I_A モデルを膜電位固定したときの動特性およびピーク振幅の電位依存特性を図3に示す。

〈3・3〉 I_{K_A} のモデル この電流は -60 mV 付近から過分極側では大きな内向き電流、 -60 mV より脱分極側ではわずかな外向き電流を生じる。また、立ち上がりは他の電流と比較して速く、時間的な不活性化もみられないため動特性は省略した。

生理実験より得られた膜電位に対する I_{K_A} の特性より、 g_{K_A} の特性を次式により求めた。ただし、 E_K は

(a) 電流波形 ($V = -90, -60, -30 \text{ mV}$)
(b) I - V 特性

図 4 I_{K_a} モデルのシミュレーション結果
Fig. 4. Simulation results of I_{K_a} model.

この電流の反転電位 -60 mV である。

$$g_{K_a} = I_{K_a} / (V - E_K) \quad (17)$$

これより、 g_{K_a} および I_{K_a} は、

$$m_{K_a} = \frac{1}{1 + \exp((V + 30)/15)} \quad (18)$$

$$g_{K_a} = \overline{g_{K_a}} m_{K_a}^4$$

$$I_{K_a} = g_{K_a} (V - E_K) \quad (19)$$

$$\overline{g_{K_a}} = 7 (\text{nS})$$

と表せる。

この電流については、動特性を無視したため電流振幅の膜電位依存特性のみを図 4 に示す。

〈3・4〉 I_{K_v} のモデル I_{K_v} は、静止電位より脱分極側で活性化される K 電流で、 H - H の K 電流と同様に次のように記述した。

$$\alpha_{m_{K_v}} = \frac{20(80 - V)}{1 - \exp\{(80 - V)/18\}} \quad (20)$$

$$\beta_{m_{K_v}} = 5 \exp\{-V/18\} \quad (21)$$

$$\frac{dm_{K_v}}{dt} = \alpha_{m_{K_v}}(1 - m_{K_v}) - \beta_{m_{K_v}}m_{K_v} \quad (22)$$

$$g_{K_v} = \overline{g_{K_v}} m_{K_v}^4$$

$$I_{K_v} = g_{K_v} (V - E_K) \quad (23)$$

$$\overline{g_{K_v}} = 1 (\text{nS})$$

I_A と同様に、この電流の膜電位固定状態での動特

(a) 電流波形 ($V = -20, 0, 20 \text{ mV}$)
(b) I - V 特性

図 5 I_{K_v} モデルのシミュレーション結果
Fig. 5. Simulation results of I_{K_v} model.

性および最大振幅の電位依存特性を図 5 に示す。

〈3・5〉 I_{glu} のモデル 単離水平細胞の外液に Glutamate を加えると水平細胞の I - V 特性に著しい変化が見られるが⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾、これは Glutamate による I_{K_a} の抑制と、 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} などの陽イオンによって運ばれるイオン電流 (Glutamate sensitive current: I_{glu}) の活性化によるものであることが、実験的に示されている⁽¹²⁾。すなわち、Glutamate は、視細胞から水平細胞への伝達物質の候補と考えられ、光の照射による放出量の減少によって水平細胞は過分極応答を示すと考えられている。この意味で I_{glu} は、水平細胞の光応答に大きく関与していると考えられる。

さて、 I_{glu} の I - V 特性は、 I_{K_a} を 10 mM のセシウムによってブロックした後、Glutamate の作用前と作用後の I - V 特性の差を求めることにより得られた。しかし、その動特性は実験的には得られておらず、ここでは現在知られている電位依存特性のみを次式のように記述した。なお、先に述べた各電流成分は単一イオンによって生じるものであり、細胞内外のイオン濃度差の変化を起電力の変化として記述できることから起電力とコンダクタンスという形でモデル化した。が、 I_{glu} は実験より単一イオンによる電流でないと考えられることから、これまでのような記述は行わなかった。

図 6 I_{glu} モデルの I - V 特性
Fig. 6. I - V characteristics of I_{glu} model.

$$I_{glu} = \bar{I}_{glu} \frac{\exp((V+10)/125) - 1}{\exp((10-V)/125) + 1} \dots (24)$$

$$\bar{I}_{glu} = 300 (\text{nS})$$

図 6 に、この電流の電位依存特性を示す。

〈3・6〉 I_1 のモデル 最後に、膜の漏れ電流成分は図 1 の実験結果において、すべてのイオン電流をブロックした後に残る電流である。この成分は -60mV 付近に反転電位を持ち、電位変化にはほぼ比例して変化することから次式で表した。

$$I_1 = g_1(V - E_1) \dots (25)$$

$$g_1 = 0.5 (\text{nS})$$

$$E_1 = -60 (\text{mV})$$

4. 単離水平細胞モデルとその特性

〈4・1〉 Voltage clamp シミュレーション 前節でモデル記述したイオン電流 ((8), (16), (19), (23) ~ (25) 式) を用い、単離水平細胞は図 7 の等価回路で表される。すなわち、単離水平細胞は、各イオン電流および膜容量 C が細胞内と外液間に並列に接続された電気回路として記述される。この等価回路より、膜電位 V は次式で与えられる。

$$\frac{dV}{dt} = \frac{1}{C} \{ I - (I_{Ca} + I_A + I_{Ka} + I_{Kv} + I_{glu} + I_1) \} \dots (26)$$

Voltage clamp の条件下では膜電位が一定、すなわち $dV/dt=0$ であるから、このとき (26) 式は、

$$I = I_{Ca} + I_A + I_{Ka} + I_{Kv} + I_{glu} + I_1 \dots (27)$$

となり、イオン電流の総和が膜を通過する全電流となる。

このモデルにおいて、Glutamate を作用させない場合 ($I_{glu}=0$) の Voltage clamp シミュレーション結果を図 8 に示す。図 8 (a) は電流応答波形、図 8 (b) はクランプ電圧印加後 0.2 秒と 4.8 秒における I - V 特

図 7 単離水平細胞の等価回路
Fig. 7. Equivalent circuit of solitary horizontal cell.

図 8 Voltage clamp シミュレーション結果
Fig. 8. Voltage clamp simulation results.

性であり、共に図 1 に示した実験結果に近い特性が再現されている。次に、 $I_{glu} \neq 0$ の場合の I - V 特性は図 9 のように大きく変化し、図 8 で見られた負性抵抗特性がかなり小さくなっていることがわかる。

〈4・2〉 Current clamp シミュレーション 前節

図 9 I_{glu} 活性化による $I-V$ 特性の変化
Fig. 9. Changing of $I-V$ characteristics by activation of I_{glu} .

図 10 Current clamp シミュレーション結果
Fig. 10. Current clamp simulation results.

で示したように、イオン電流を基に再構成した単離水平細胞モデルの $I-V$ 特性は実際の特性に近いことが確認された。そこで、このモデルをテストする意味から膜を通過する電流を一定にしたときの膜電位応答を求める Current clamp シミュレーションを行った。

Current clamp の条件下では、(26)式を

$$V = \int \frac{1}{C} (I - (I_{Ca} + I_A + I_{Kv} + I_{Kd} + I_{Kv} + I_{glu} + I_1)) dt + V_0 \dots \dots \dots (28)$$

V_0 : 静止膜電位

と変形し、イオン電流に対する膜電位 V が求まる。ここで、膜容量を決める必要があるが、この値はシミュレーションの結果、得られた応答の時間幅や振幅より $C=12.5$ pF と決めた。

図 11 活動電位発生時のイオン電流波形
Fig. 11. Ionic current waveforms during the action potential.

単離水平細胞について Current clamp を行ったとき、図 10(a) に示すようなカルシウムスパイクと呼ばれる活動電位が発生することが実験的に示されており⁽¹³⁾、シミュレーションにおいても図 10(b)のように、実験結果と同様の波形が再現された。図 11 は、この活動電位発生時の各イオン電流成分を示したものである。これより、スパイクの立ち上がりには I_{Ca} 、 I_A 成分が大きく関与しており、細胞内部へのカルシウムイオン流入による I_{Ca} の不活性と I_{Kv} のバランスによって静止電位へ戻るタイミングが決まることがわかる。

5. む す び

本研究では、生理実験により測定されたデータを基にイオン電流をモデル化し、これを用いて単離水平細胞応答の再構成を行った。こうして得られたモデルは、生理実験データとの比較により、実際の細胞膜の特性に近いと考えられ、今後水平細胞層の重要な機能である空間平滑機構の解明⁽¹⁴⁾、双極細胞との結合⁽¹⁵⁾

および視細胞へのフィードバックなどの解析⁽¹⁶⁾で大いに役立っただけでなく、生理実験結果の裏付けを行う意味でも広く活用できるものとする。

謝辞 日頃御指導賜わる中京大学 御手洗玄洋教授、生理学研究所 金子章道教授、立花政夫博士に感謝する。また、貴重な討論をいただいた本学 村瀬一之助手に深謝する。本研究の一部は昭和 59 年度文部省科学研究費、一般研究 C (59550261) の援助を受けた。

(昭和 63 年 1 月 25 日受付)

文 献

- (1) J. E. Dowling: "The Retina", Harvard Univ. Press (1987)
- (2) M. Tachibana: "Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina", *J. Physiol.*, **345**, 329-351 (1983)
- (3) A. Kaneko & M. Tachibana: "A voltage clamp analysis of membrane currents in solitary bipolar cells dissociated from *Carassius Auratus*", *J. Physiol.*, **358**, 131-152 (1985)
- (4) A. Kaneko & M. Tachibana: "Membrane properties of solitary retinal cells", *Prog. in Retinal Res.*, 125-146 (1986)
- (5) A. L. Hodgkin & A. F. Huxley: "A quantitative description of membrane current and its application to condition and excitation in nerve", *J. Physiol.*, **117**, 500-544 (1952)
- (6) 松田・臼井: 「ミニコンによる会話型連統系シミュレータ」, 信学技研, **MBE-81-57**, 75-82 (昭 56)
- (7) D. Jung: "Nerve and muscle excitation", (2ed) Sinauer (1981)
- (8) R. Shingai & B. N. Christensen: "Excitable properties and voltage-sensitive ion conductances of horizontal cells isolated from catfish (*Ictalurus punctatus*) retina", *J. Neurophysiol.*, **56**, 32-49 (1986)
- (9) R. Llinás, Z. Steinberg & K. Walton: "Presynaptic calcium currents in squid giant synapse", *Biophys. J.*, **33**, 298-322 (1981)
- (10) T. A. Ishida, A. Kaneko & M. Tachibana: "Responses of solitary retinal horizontal cells from *Carassius Auratus* to L-glutamate and related amino acids", *J. Physiol.*, **348**, 255-270 (1983)
- (11) M. Tachibana: "Permeability changes induced by L-glutamate in solitary retinal horizontal cells isolated from *Carassius Auratus*", *J. Physiol.*, **358**, 153-167 (1985)
- (12) A. Kaneko & M. Tachibana: "Effects of L-glutamate on the anomalous rectifier K current in horizontal cells of *Carassius Auratus* retina", *J. Physiol.*, **358**, 169-182 (1985)
- (13) M. Tachibana: "Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina", *J. Physiol.*, **321**, 141-161 (1981)
- (14) S. Usui, M. Sakakibara & G. Mitarai: "Discrete non-linear reduction model for Horizontal cell response in the carp retina", *Vision Res.*, **23**, 413-420 (1981)
- (15) 臼井, 他: 「脊椎動物網膜の視覚センサ機能と構造(その時空間・色覚過程)」, バイオメカニズム 7, ——人間の機能と再生——(バイオメカニズム学会編), 東大出版, 41-49 (昭59)
- (16) 金子: 「網膜における情報処理」, 生体の科学, **38**(4), 299-304 (昭 62)