

マウス網膜における NMDA 型受容体チャネル GluR ϵ 1 サブユニットの分布と機能

葉山文恵

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻

感覚統合医学講座視覚病態学分野 (眼科学教室)

(主任：阿部春樹教授)

Synaptic Localization and Physiological Function of NMDA Receptor GluR ϵ 1 Subunit in the Mouse Retina

Fumie HAYAMA

Division of Ophthalmology and Visual Science,

Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University

(Director: Prof. Haruki ABE)

Abstract

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the vertical signal pathway in the vertebrate retina. There are a variety of glutamate receptors (GluRs) in the retina, out of which NMDA receptor is known to regulate synaptic neurotransmission. In order to clarify its function in the retina, I selected GluR ϵ 1, one of four NMDA receptor ϵ subunits, and analyzed the GluR ϵ 1 subunit knockout mouse. Immunohistochemistry showed GluR ϵ 1, ϵ 2, ζ 1 subunit expressions in the outer two-fifth of the inner plexiform layer (IPL) where bipolar cells transfer mostly the OFF signal to amacrine and ganglion cells, suggesting that these subunits were expressed in ganglion and amacrine cells and might participate mainly in the OFF pathways. Physiological functions of the retina were analyzed by electroretinogram (ERG). No significant difference was observed in the amplitude and implicit time of b-wave and amplitude of OPs between wild-type and GluR ϵ 1 knockout mice, although there are some reports showing that NMDA receptors are involved in ERG b-wave and oscillatory potentials (OPs). The phenomenon that NMDA currents were reduced but remained in the area where GluR ϵ 1 and ϵ 2 were co-localized suggests that GluR ϵ 2 subunit might have compensated for the deletion of GluR ϵ 1. This is the first study applying ERG in the functional analysis of GluR ϵ 1 in retina.

Key words: NMDA receptor, GluR ϵ 1 subunit, OFF sublamina, electroretinogram, b-wave

Reprint requests to: Fumie HAYAMA
Division of Ophthalmology and Visual Science
Graduate School of Medical and Dental Science
Niigata University
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学
専攻感覚統合医学講座視覚病態学分野(眼科学教室)
葉山文恵

はじめに

脊椎動物の網膜において、外網状層では視細胞から双極細胞及び水平細胞に、内網状層では双極細胞からアマクリン細胞や網膜神経節細胞に垂直方向のシグナル伝達が行われており、その興奮伝達を担う主要な神経伝達物質はグルタミン酸である。網膜におけるグルタミン酸の様々な機能活性は、その受容体の多様性に起因すると考えられている¹⁾。グルタミン酸受容体 (GluRs) は代謝型とイオン透過型とに分類され、イオン透過型はさらにアゴニストに対する感受性に基づいて α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) 型、カイニン酸型、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型に分類される。このうち電位依存的活性調節とカルシウムイオンの高い透過性を持つ NMDA 型受容体は、シナプス伝達効率の調節に関与することが知られており、シナプス可塑性の鍵を握る分子と考えられている。この受容体は、遺伝子クローニングとその機能発現解析により、1種類の GluR ζ 1 サブユニットと4種類の GluR ϵ 1 (NR2A), ϵ 2 (NR2B), ϵ 3 (NR2C), ϵ 4 (NR2D) サブユニットの組み合わせにより構成されるヘテロオリゴマーで働くことが判明している他、NR3A, 3B など活性調節サブユニットの存在も知られている²⁾。さらに、GluR ζ 1 サブユニットには alternative splicing によりさらに8つの splice variant が存在しており、受容体機能との関連が議論されている³⁾。NMDA 型受容体チャンネルは、構成される GluR ϵ サブユニットにより薬理学的・電気生理学的特性が異なっており、この受容体の機能的な多様性の分子基盤が GluR ϵ サブユニットであることが明らかにされている²⁾⁴⁾。脳においては時期や部位により異なる GluR ϵ サブユニットが発現し、NMDA 型受容体チャンネルの多様な生理機能を分担していると考えられている。

網膜において、NMDA 型受容体の研究は、*in situ* hybridization により mRNA レベルで NMDA 受容体サブユニットの局在は確認されているが^{5)–7)}、各サブユニットのシナプスでの局在を解析した報

告は少ない⁸⁾。さらに、網膜機能における NMDA 型受容体の役割について、光刺激に対する網膜の反応をとらえる網膜電位図 (ERG) による解析がなされてきたが、NMDA 拮抗薬が b 波を減弱させる^{9) 10)} という報告がある一方、NMDA 拮抗薬は b 波には影響を与えない^{11)–13)} という報告もあり、その評価は一定ではない。一方、NMDA をネコ硝子体内に注入することにより律動小波 (Oscillatory potentials; OPs) 波振幅が減弱したという報告もあり、NMDA 型受容体が ERG に何らかの影響を与えていることは推察されている¹¹⁾。

本研究の目的は NMDA 型受容体の網膜における生理機能を解析することである。このために網膜における NMDA 型受容体サブユニットの分布を免疫組織学的に検索するとともに、この受容体の薬理学的・電気生理学的特性を決定する GluR ϵ サブユニットのうち網膜における局在が確認されている GluR ϵ 1 サブユニットに着目し、このサブユニット遺伝子を欠損したマウスを用いて、ERG により解析した。

材料と方法

動物

週齢 8 ~ 10 週の NMDA 型受容体 GluR ϵ 1 サブユニットノックアウトマウス¹⁴⁾ を使用した。対照として遺伝子背景を同一にする C57BL/6 マウスを使用した。なお、すべての動物実験は、新潟大学動物実験規則および指針に従った。

免疫組織化学

ペントバルビタール (75mg/kg) で全身麻酔後に 4% パラホルムアルデヒド (pH7.4) を用いて全身灌流固定した。眼球を摘出し前眼部を除去してから同固定液で1時間後固定を行った。以後常法により 5 μ m 厚の網膜断層のパラフィン切片を作製した。通常の免疫組織化学的処理の前に、NMDA 受容体サブユニットの免疫組織学的検出に重要であるペプシン処理 (0.25mg/ml 0.2N HCl, 37 $^{\circ}$ C, 7分) を行った^{15)–17)}。引き続き切片をブロッキング (10% ヤギ血清) 30分、一次抗体一晚、二次抗体 (ビオチン標識抗ウサギ IgG

抗体) 2時間, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン 30分間反応させた後, tyramide signal amplification system (Alexa 546; Molecular Probes, Eugene, OR) で発色させた. NMDA サブユニットに対する抗体はウサギ抗 GluR ϵ 1 抗体¹⁵⁾, ウサギ抗 GluR ϵ 2 抗体¹⁵⁾, ウサギ抗 GluR ϵ 3 抗体¹⁶⁾, モルモット抗 GluR ζ 1C2'抗体¹⁷⁾ をそれぞれ 1 μ g/ml の濃度で用いた. ブロッキング, 二次抗体, ストレプトアビジンは Histofine SAB-PO (R) kit (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いた.

網膜電位図

マウスを一晩暗順応させウレタン (2.0mg/kg) 腹腔内投与により全身麻酔を施した. トロピカミド・フェニレフリン点眼により散瞳し, 全身麻酔による体温低下を回避するためにホットパッドを用いてマウスを保温した. ERG は関電極を角膜表面に, 不関電極を角膜輪部付近に, 接地電極を耳朶に設置した. Ganzfeld 刺激装置を用いて最大 1.0 log cd - s/m² (photopic units) のストロボ刺激を与え, 刺激強度を減弱させるために中性フィルターを使用した. Scotopic ERG の記録には - 6.2 から 1.0 log cd - s/m² までの 7段階の刺激強度を与え, photopic ERG の記録には杆体を抑制するために 1.3 log cd - s/m² の白色背景光下で - 0.8 から 1.0 log cd - s/m² までの 4段階の刺激を与えた. Scotopic ERG の刺激間隔は低輝度で 3秒間隔, 高輝度では 60秒間隔, photopic ERG の刺激間隔は 1秒間隔とした. 応答は 0.3 - 1000Hz の帯域フィルターで増幅し, OP 波を取り出す際には 75 - 1000Hz 帯域フィルターを用いた. 基準からのノイズは 60Hz のノッチフィルターを用いて除去した. 3 - 20 回の応答を long interstimulus (Power Lab, AD Instruments, Castle Hill, Australia) を用いて平均化した. 本実験においては scotopic ERG の a 波, b 波の振幅と潜時および photopic ERG の b 波の振幅について解析した. さらに scotopic ERG では最大刺激強度 1.0 log cd - s/m² における各 OP 波 (OP1 - 4) の振幅についても解析した. a 波振幅は刺激前の基準線から a 波最低点までを, b 波振幅は a 波最低点から b 波頂点までとした. 潜時はフラッシュ刺激開始から波の頂点までの時

間とした. 各 OP 波の振幅は最初の陰性の最低点から陽性の頂点までとした. 有意差検定には ANOVA 解析を行った.

結 果

NMDA 型受容体は 2つのサブユニットファミリー GluR ζ 1 と ϵ により構成されるヘテロマーと考えられている^{2) - 3)}. 本研究では, まず網膜における NMDA 型受容体各サブユニットの分布を免疫組織学的手法を用いて蛋白レベルで解析した. GluR ϵ 1, ϵ 2, ϵ 3 それぞれのサブユニットに特異的なウサギ抗体を用いて, 成体網膜でこれら分子の分布を解析した結果, 野生型マウスでは GluR ϵ 1 が内網状層の特に外側に多く存在していることが明らかになった (図 1B). 一方, GluR ϵ 1 ノックアウトマウスでは網膜における GluR ϵ 1 免疫反応は認められず, 用いた抗体の特異性と結果の信頼性が裏付けられた (図 1A). また, GluR ϵ 2 も内網状層外側に優位に局在が認められたが (図 1C), GluR ϵ 3 については網膜において明確な免疫反応が認められなかった (データ提示なし). GluR ζ 1 サブユニットには 8つの splice variant が知られており³⁾, GluR ζ 1 サブユニットの 3a, 3b, 4a, 4b を認識する GluR ζ 1C2' に対するモルモットポリクローナル抗体を用いてその分布を検索した. その結果, GluR ζ 1C2' も内網状層外側に高濃度で存在することが明らかになった (図 1D).

網膜電位図

in vivo における網膜の機能を評価するために, 10 週齢の野生型マウスと GluR ϵ 1 ノックアウトマウスを各々 4 匹用いて, 暗順応下もしくは明順応下において様々な刺激強度で ERG を測定した. 図 2-1 は暗順応下で 7段階の刺激を与え記録した scotopic ERG 波形である. 最も弱い刺激で, 網膜内層の膜電位から生じる scotopic negative response (STR) を記録しようとしたがいずれのマウスにおいても STR は記録できなかった. これはケタミンの代わりにウレタンを麻酔に用いたためと考えられる. b 波は脱分極性杆体双極細胞の機能を反映していると考えられている¹⁸⁾. こ

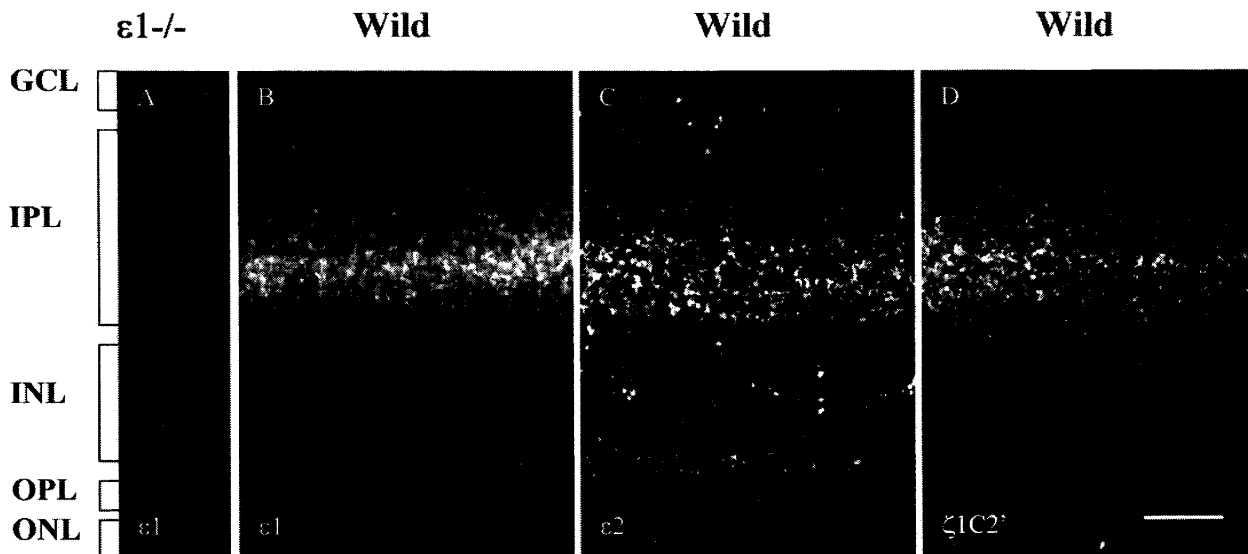


図 1

(A) GluR ϵ 1 ノックアウトマウスの抗 GluR ϵ 1 抗体による免疫反応. (B) 野生型マウスの抗 GluR ϵ 1 抗体による免疫反応. (C) 野生型マウスの抗 GluR ϵ 2 抗体による免疫反応. (D) 野生型マウスの抗 GluR ϵ 1 抗体による免疫反応. スケールバーは 20 μ m を示す.

GCL; 網膜神経節細胞層 IPL; 内網状層 INL; 内顆粒層 OPL; 外網状層 ONL; 外顆粒層

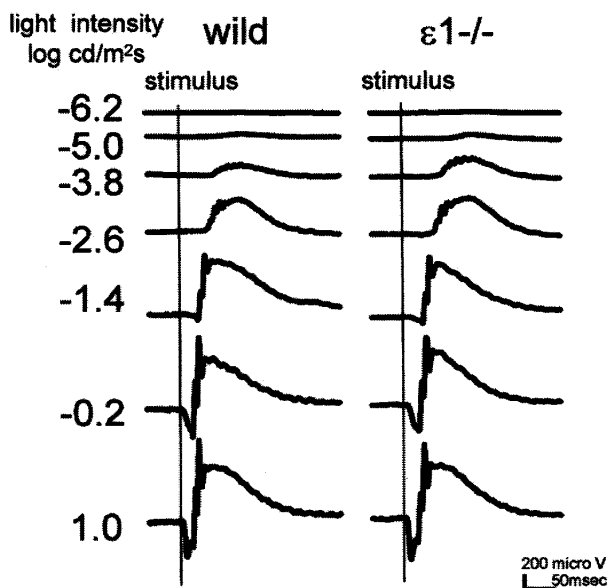


図 2-1

野生型マウスと GluR ϵ 1 ノックアウトマウスにおける scotopic ERG. マウスを一晩暗順応させた後, Ganzfeld 刺激装置を用いて 7 段階のストロボ刺激を与え反応を記録した.

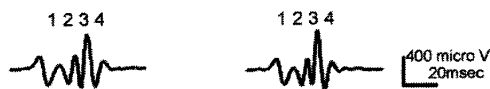


図 2-2

野生型マウスと GluR ϵ 1 ノックアウトマウスの最大刺激 (1.0 log cd - s/m²) に対する律動小波 (OPs).

の b 波は, 刺激強度 - 5.0 log cd - s/m² より出現し, 刺激強度を強くするに従い振幅は大きくなった. 刺激強度 - 1.4 log cd - s/m² より negative a 波が出現し, 刺激強度の増加に伴いより明確となった. a 波は視細胞の機能を表すと報告されている¹⁹⁾. 図 2-2 は high pass filter を用いて同じマウスに対する最大刺激 (1.0 log cd - s/m²) における ERG から各 OP 波を取り出したものである. OP 波は網膜内層のアマクリン細胞から開始する抑制性フィードバックによるシナプス活動を反映すると考えられている²⁰⁾. 波形からは野生型マ

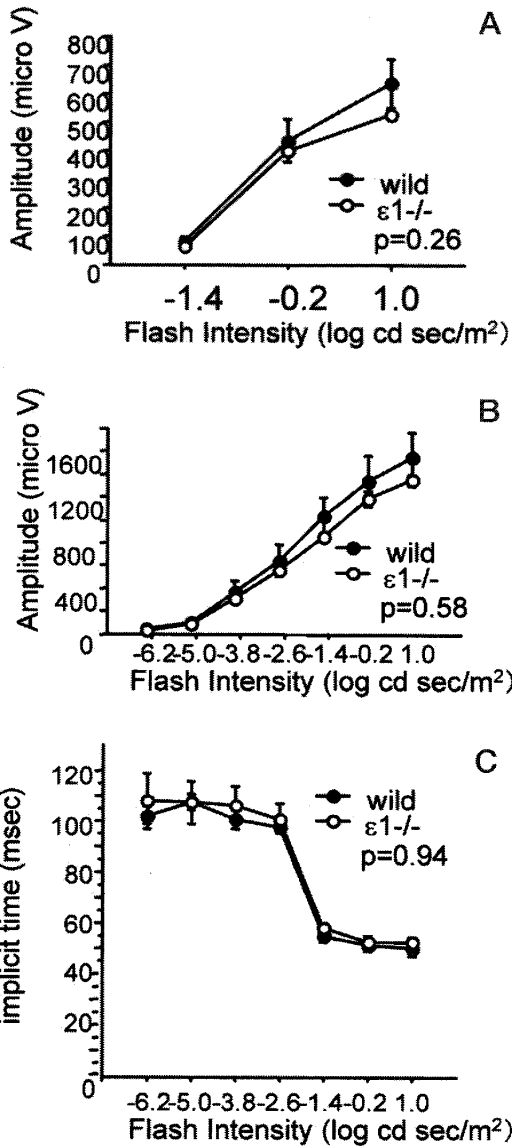


図 2-3

野生型マウス (○) と GluR $\epsilon 1$ ノックアウトマウス (●) の scotopic ERG の各成分の解析. (A) a 波の平均振幅 (± 1 SEM). (B) b 波の平均振幅 (± 1 SEM). (C) b 波の平均潜時 (± 1 SEM).

ウスと GluR $\epsilon 1$ ノックアウトマウスとの間に差は認められなかった. 2つの群の波形の差を検出する目的で, ERG のいくつかの成分について検討した. Scotopic a 波, b 波の振幅, b 波潜時は刺激強度の全範囲において野生型マウスとノックアウト

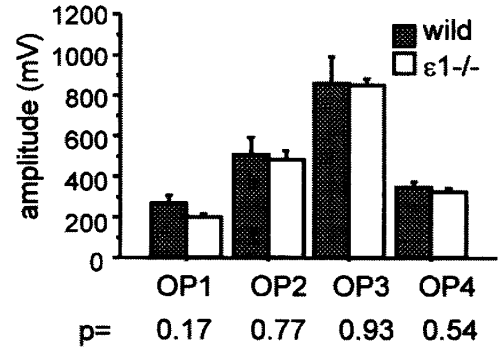


図 2-4

野生型マウスと GluR $\epsilon 1$ ノックアウトマウスの最大刺激 (1.0 log cd-s/m²) に対する OP1-4 の平均振幅.

マウスにおいて有意差は認められなかった (a 波振幅 $p = 0.264$, b 波振幅 $p = 0.58$, b 波潜時 $p = 0.94$) (図 2-3). Scotopic ERG の明るいフラッシュ刺激に対する 4 つの OP 波 (OP1-4) についても検討したが, 2 群に有意差は認められなかった ($p = 0.17$, $p = 0.77$, $p = 0.93$, $p = 0.54$) (図 2-4). Photopic ERG の結果を図 3-1 に示した. 刺激強度は 4 段階である. 反応は刺激強度の増加に伴い大きくなった. 角膜陽性波 (photopic ERG b 波) は視細胞後電位由来と考えられているが¹³⁾, b 波振幅について 2 群間に有意差は認められなかった ($p = 0.38$) (図 3-2).

考 察

これまでに網膜における NMDA 受容体の局在は *in situ* hybridization によって示されてきた⁵⁾⁻⁷⁾. GluR $\epsilon 1$ サブユニットは神経節細胞層, 内顆粒層アマクリン細胞層にシグナルが検出されたことから神経節細胞, アマクリン細胞に局在し, GluR $\epsilon 2$, $\zeta 1$ サブユニットは神経節細胞層, 内顆粒層全層にシグナルが検出されたことから, 神経節細胞, アマクリン細胞の他, 双極細胞, 水平細胞にも局在している可能性が考えられる⁶⁾. 一方, *in situ* hybridization は mRNA の発現を検討しているものであり, シナプス局在を示すものではない. そ

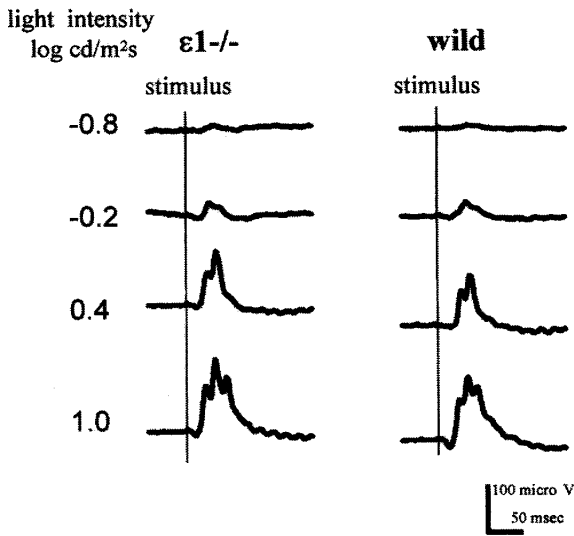


図 3-1

野生型マウスと GluR ϵ 1 ノックアウトマウスの photopic ERG. マウスを明順応させた後、1.3 log cd-s/m²の白色背景光下で4段階のストロボ刺激を与え反応を記録した。

ここで本研究では NMDA 受容体の網膜内における局在を免疫組織学的に検索した。その結果、GluR ϵ 1, ϵ 2, ζ 1 はいずれも内網状層に局在が確認された。この領域では双極細胞が網膜神経節細胞やアマクリン細胞とシナプスを形成しており、NMDA 受容体がシナプス後膜に存在するという知見から、GluR ϵ 1, ϵ 2, ζ 1 サブユニットは神経節細胞、アマクリン細胞シナプスに集積している可能性が示された。これらは *in situ* hybridization の結果からも支持される。また、NMDA アナログや MK-801 のような NMDA 受容体拮抗薬を用いた薬理学的研究においても、NMDA 受容体は主に 3 次ニューロン、すなわち網膜神経節細胞と一部のアマクリン細胞に存在していると考えられており^{21)–23)}、この報告結果とも一致する。

Cajal によれば、内網状層は等しい厚さで 5 層に分けることができる²⁴⁾。内顆粒層側 2/5 は sublamina a もしくは OFF sublamina と呼ばれ、主に OFF pathway が関与している。一方、網膜神経節細胞層側の 3/5 は sublamina b もしくは ON

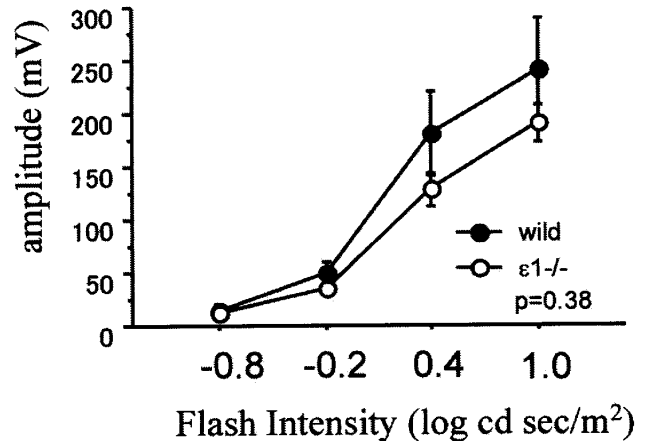


図 3-2

野生型マウス (○) と GluR ϵ 1 ノックアウトマウス (●) の photopic ERG の b 波の平均振幅 (± 1 SEM)。

sublamina と呼ばれ、主に ON のシグナル伝達が行われている。また ON-OFF 応答は両 sublamina にみとめられる²⁵⁾。GluR ϵ 1, ϵ 2, ζ 1 サブユニットは内網状層外側に優位に局在がみとめられた。Grünertらはサル網膜において GluR ϵ 1 は sublamina 2, 4 に発現をみとめたと報告しているが、GluR ϵ 1 ノックアウトマウスをネガティブコントロールとした今回の結果では、マウス網膜においては特に sublamina 4 に相当する部位で高濃度に局在していた。以上のことから、GluR ϵ 1 は特に OFF 経路に関与している可能性が考えられた。

網膜機能における NMDA 型受容体 GluR ϵ 1 サブユニットの機能を明らかにするために、この分子のノックアウトマウスで ERG を行った。これまで拮抗薬などを用いた薬理学的研究によって、ERG への NMDA 型受容体の関与は指摘されてきたが、分子レベルでの検証は本研究が最初のものである。b 波は一般的に ON 型双極細胞が起源であるとされてきた¹⁸⁾ が、NMDA 型受容体が b 波の発生に関与している可能性についても報告されている^{9) 10)}。Wurzigerらは Royal College of Surgeons (RCS) ラットの単離網膜において非競合性 NMDA 型受容体拮抗薬であるケタミンが b 波を減弱させ、NMDA 型受容体を有する 3 次ニ

ニューロンがb波に寄与している可能性を報告した⁹⁾。またLichtenbergerらは無麻酔のウサギのb波と比較して、ケタミンによる全身麻酔をしたウサギではb波が有意に減弱したと報告した¹⁰⁾。一方でHuangらは*in vitro*で非競合性NMDA受容体拮抗薬であるケタミン、MK-801、デキストロメソルファンがERGのb波に影響を与えなかったと報告した¹²⁾。さらにNMDA投与によりb波が増強したという報告も散見され¹¹⁾¹³⁾、b波は主にNMDA抵抗性の2次ニューロンが起源であることが考えられた。今回の実験結果では、野生型マウスと比較して、GluR ϵ 1ノックアウトマウスにおける暗所下、明所下のb波はいずれも軽度減弱していたが野生型マウスと比較して有意差は認められず、少なくともGluR ϵ 1サブユニットはb波の発生に関して明らかな寄与はないと考えられた。

OP波はscotopic ERGにおいて、b波に重積する高振幅の成分であり、内網状層内の双極細胞軸索末端、アマクリン細胞樹状突起、神経節細胞樹状突起の関与する網膜神経回路内のフィードバック機構を反映していると考えられている¹⁸⁾。GluR ϵ 1サブユニットがアマクリン細胞や神経節細胞に発現していることから、OP波の変化がもっとも期待されたが、野生型マウスとGluR ϵ 1ノックアウトマウスにおいてOP波振幅における有意差は認められなかった。ネコ硝子体内にNMDAを注入することにより、OP波の軽度の可逆的な減少をもたらしたという報告があり¹¹⁾、NMDA型受容体がOP波の産生に寄与している可能性も考えられているが、今回の結果からはGluR ϵ 1サブユニットはERG変化をもたらすような明らかな電気的現象には重要な役割を果たしていないと考えられた。

今回の結果からはGluR ϵ 1サブユニットとERGに明確な関連はみとめられなかった。しかしGluR ϵ 1、 ϵ 2サブユニットが共存している領域では、NMDA電流が軽度減少するがある程度残るという現象がある。GluR ϵ 1サブユニットの欠損はGluR ϵ 2サブユニットにより代償されている可能性もあり、NMDA型受容体とERGとの関連に

ついては更なる検討が必要と考えられた。

結 語

本研究ではNMDA型受容体GluR ϵ 1サブユニットノックアウトマウスを用いることにより、GluR ϵ 1サブユニットの網膜における局在を正確に示すことができた。NMDA型受容体GluR ϵ 1、 ϵ 2、 ζ 1サブユニットは内網状層のOFF sublaminaに優位に局在していることが判明した。また、これまでNMDA型受容体のERGへの関与に関して議論が分かれていたが、少なくともGluR ϵ 1サブユニットはERGに明確な関与をみとめなかった。本研究はERGとNMDA型受容体GluR ϵ 1サブユニットの関連をはじめて示したものである。

謝 辞

網膜電位図測定に関してご協力いただいた近藤峰生先生、上野真治先生(名古屋大学眼科学教室)、白井知聡先生、免疫組織学的手法に関してアドバイスをいただいた阿部 学先生(脳研究所細胞神経生物学教室)、本研究について直接のご指導と本稿のご校閲をいただきました崎村建司先生(脳研究所細胞生物学教室)及び阿部春樹教授に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Foster AC and Gaff CE: Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 7: 103 - 164, 1984.
- 2) Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B and Seeburg PH: Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256: 1217 - 1221, 1992.
- 3) Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G and Heinemann S: Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10:

- 943 - 954, 1993.
- 4) Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M and Mishima M: Molecular diversity of the NMDA receptor channel, *Nature (London)* 358: 36 - 41, 1992.
 - 5) Kreutz MR, Bockers TM, Böckmann J, Seidenbecher CI, Kracht B, Vorwerk CK, Weise J and Sabel BA: Axonal injury alters alternative splicing of the retinal NR1 receptor: the preferential expression of the NR1b isoforms is crucial for retinal ganglion cell survival. *J Neurosci* 15: 8278 - 8291, 1998.
 - 6) Watanabe M, Mishina M and Inoue Y: Differential distributions of NMDA receptor channel subunit mRNAs in mouse retina. *Brain Res* 34: 328 - 332, 1994.
 - 7) Brandstätter JH, Harveit E, Sassoè - Pognetto M and Wassle H: Expression of NMDA and high affinity kainite receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci* 6: 1100 - 1112, 1994.
 - 8) Grünert U, Haverkamp S, Fletcher EL and Wassle H: Synaptic distribution of ionotropic glutamate receptors in the inner plexiform layer of the primate retina. *J Comp Neurol* 447: 138 - 151, 2002.
 - 9) Wurziger K, Lichtenberger T and Hanitzsch R: On - bipolar cells and depolarizing third - order neurons as the origin of the ERG - b - wave in the RCS rat. *Vis Res* 41: 1091 - 1101, 2001.
 - 10) Lichtenberger T, Karbaum R, Flade A and Hanitzsch R: Low b - wave amplitudes in a strain of rabbits with a pigment epithelium defect. *Vis Res* 40: 129 - 136, 2000.
 - 11) Vaegan and Millar TJ: Effect of kainic acid and NMDA on pattern electroretinogram, the scotopic threshold response, the oscillatory potentials and the electroretinogram in the urethane anaesthetized cat. *Vision Res* 34: 1111 - 1125, 1994.
 - 12) Huang JC, Salt TE, Voaden MJ and Marshall J: Non - competitive NMDA - receptor antagonists and anoxic degeneration of the ERG b - wave *in vitro*. *Eye* 5: 476 - 480, 1991.
 - 13) Sieving PA, Murayama K and Naarendorp F: Push - pull model of the primate photopic electroretinogram: A role for hyperpolarizing neurons in shaping the b - wave. *Vis Neurosci* 11: 519 - 532, 1994.
 - 14) Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H and Mishina M: Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 subunit. *Nature* 373: 151 - 155, 1995.
 - 15) Watanabe M, Fukaya M, Sakimura K, Manabe T, Mishina M and Inoue Y: Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fibre - recipient layer) of the mouse hippocampal CA3 subfield. *Eur J Neurosci* 10: 478 - 487, 1998.
 - 16) Yamada K, Fukaya M, Shimizu H, Sakimura K and Watanabe M: NMDA receptor subunits GluR ϵ 1, GluR ϵ 3 and GluR ζ 1 are enriched at the mossy fibre - granule cell synapse in the adult mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 13: 2025 - 2036, 2001.
 - 17) Abe M, Fukaya M, Yagi T, Mishina M, Watanabe M and Sakimura K: NMDA receptor GluR ϵ /NR2 subunits are essential for postsynaptic localization and protein stability of GluR ζ 1/NR1 subunit. *J Neurosci* 24: 7292 - 7304, 2004.
 - 18) Robson JG and Frishman LJ: Response linearity and kinetics of the cat retina: the bipolar cell component of the dark - adapted electroretinogram. *Vis Neurosci* 12: 837 - 850, 1995.
 - 19) Hood DC and Birch DG: Assessing abnormal rod photoreceptor activity with the a - wave of the electroretinogram: applications and methods. *Doc Ophthalmol* 92: 253 - 267, 1996.
 - 20) Wachtmeister L: Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res* 17: 485 - 521, 1998.
 - 21) Karschin A, Aizenman E and Lipton SA: The interaction of agonists and non - competitive antagonists at the excitatory amino acid receptors

- in rat retinal ganglion cells in vitro. *J Neurosci* 8: 2895 - 2906, 1988.
- 22) Aizenman E, Frosch MP and Lipton SA: Responses mediated by excitatory amino acid receptors in solitary retinal ganglion cells from rat. *J Physiol* 396: 75 - 91, 1988.
- 23) Boos R, Schneider H and Wässle H: Voltage - and transmitter - gated currents of all - amacrine cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci* 13: 2874 - 2888, 1993.
- 24) Cajal SRy: *La rétine des vertébrés*. Cellule 9: 119 - 257, 1892.
- 25) Famiglietti EV Jr, Kaneko C and Tachibana M: Neuronal architecture of ON and OFF pathways to ganglion cells in carp retina. *Science* 198: 1267 - 1268, 1977.

(平成17年1月20日受付)
