

NMDA 受容体に対する ポリアミン の効果に関する研究

1999 年

衛生薬学講座（臨床化学研究室） 益子 崇

目次

| | 頁 |
|--|----|
| 序論 | 1 |
| 第 I 章 NMDA受容体のスペルミン結合部位の同定 | 5 |
| 第 II 章 アミノグリコシド系抗生物質のNMDA受容 体に及ぼす影響 | 18 |
| 第 III 章 神経系におけるポリアミン輸送 | 33 |
| 参考文献 | 42 |
| 要旨 | 46 |
| 論文目録 | 50 |
| 謝辞 | 51 |

序論

ポリアミンは第一級アミンを二つ以上もつ（直鎖）脂肪族炭化水素の総称であり、天然には約20種類のポリアミンの存在が明らかにされており、生体中には主にプトレッシン $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]$ 、スペルミジン $[\text{NH}_2(\text{CH})_3\text{NH}(\text{CH})_4\text{NH}_2]$ 、スペルミン $[\text{NH}_2(\text{CH})_3\text{NH}(\text{CH})_4\text{NH}(\text{CH})_3\text{NH}_2]$ の3種類が存在している。大腸菌などの細菌は通常プトレッシンとスペルミジンを、真核細胞は通常スペルミジンとスペルミンを多く含んでいる（1）。ポリアミンは生体内において、細胞増殖・分化に重要な生理的役割を果たす低分子塩基性生理活性物質で、このポリアミンによる細胞増殖促進効果は、主に1960～1970年代に見い出されたホルモン投与や肝再生などの増殖刺激によるオルニチン脱炭酸酵素（ODC）並びにS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素（SAMDC）活性の増加（1）やRussellらにより報告された癌患者の尿中ポリアミン量の増加などにより示唆されてきた（2）。その後、ポリアミン生合成酵素阻害剤を投与した細胞では増殖速度の低下が見られるが、この際ポリアミンを同時投与すると増殖が回復すること（3、4）や生合成の欠損した変異細胞では、外部からポリアミンを添加しないと細胞の増殖や維持ができないこと（5-9）が報告され、ポリアミンは細胞増殖や分化に必須の因子であることが示された。この様な背景からポリアミンの生理的役割が注目され、現在ではDNA、RNA及び蛋白質といった高分子合成の促進作用を持つことが明らかとなった（10、11）。

一方、脳では細胞増殖があまり活発ではないにも係わらず、ポリアミン量は比較的多い（12）ので、脳におけるポリアミンは核酸以外の物質との相互作用により生理的役割を果たしていることが示唆されている。近年、このポリアミンとイオンチャネルに対する役割が注目されている（13-16）が、グルタミン酸受容体の中でもNMDA（N-methyl-D-aspartate）受容体（Fig.1）は記憶形成や脳虚血時の症状悪化に強く係わっており、ポリアミン、特にスペルミンによって脱分極時の促進作用、過分極時の阻害作用（チャンネル・ブロック作用）の両活性調節を受ける（Fig.2）。グルタミン酸受容体はイオンチャンネル内在型のイオノトロピックグルタミン酸受容体とG蛋白結合型のメタボトロピックグルタミン酸受容体に大別され、各々に多くのサブタイプが存在する（17-22）。イオノトロピックグルタミン酸受容体はグリシン存在下で興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸と結合（23-26）すると、内在する陽イオン選択性チャンネルを開くことにより、興奮性シナプス後電位（EPSP：excitatory postsynaptic potential）を引き起こし、シナプスにおける情報伝達に関与している（27）。また、イオノトロピックグルタミン酸受容体はアゴニスト選択性

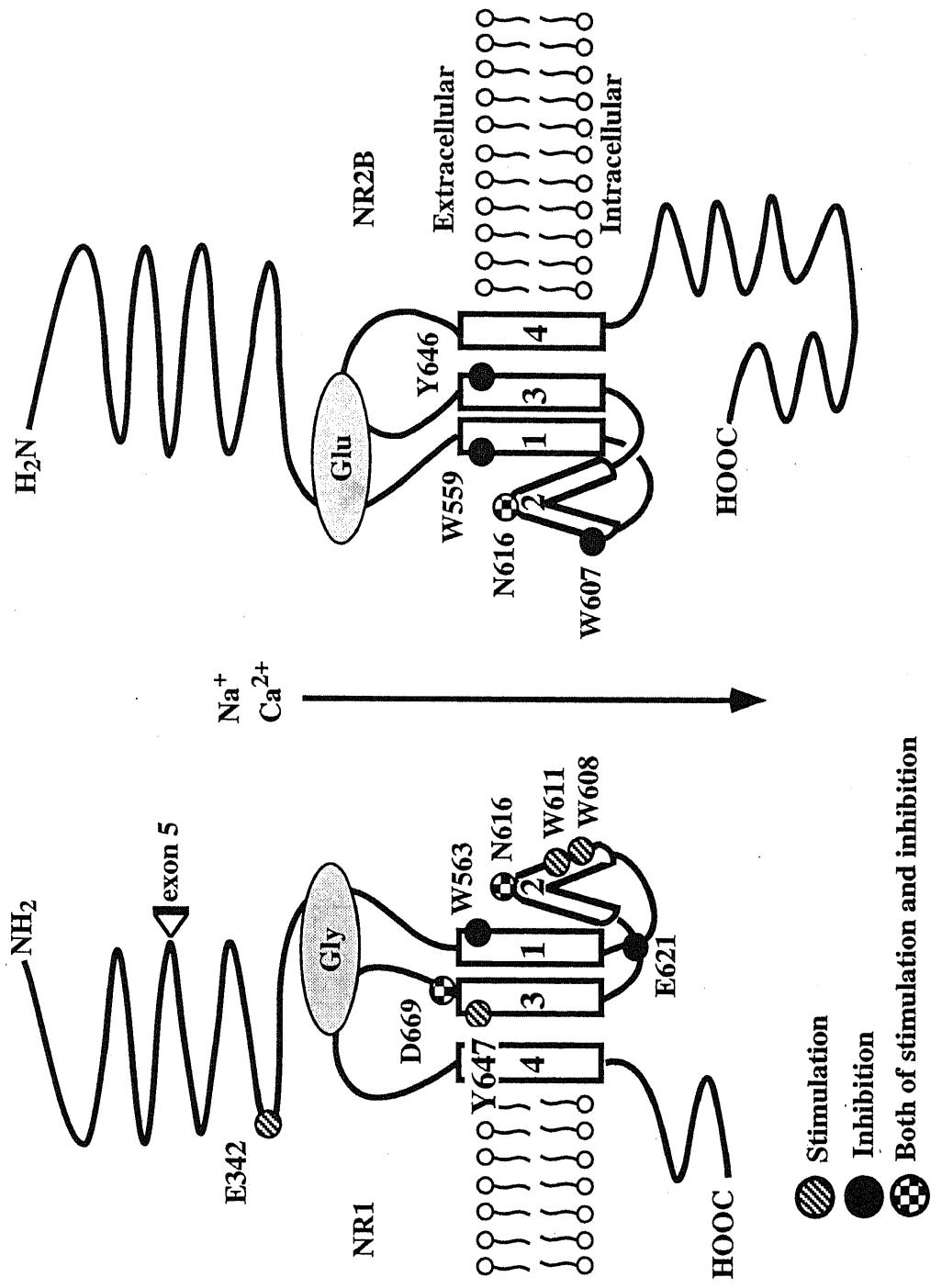
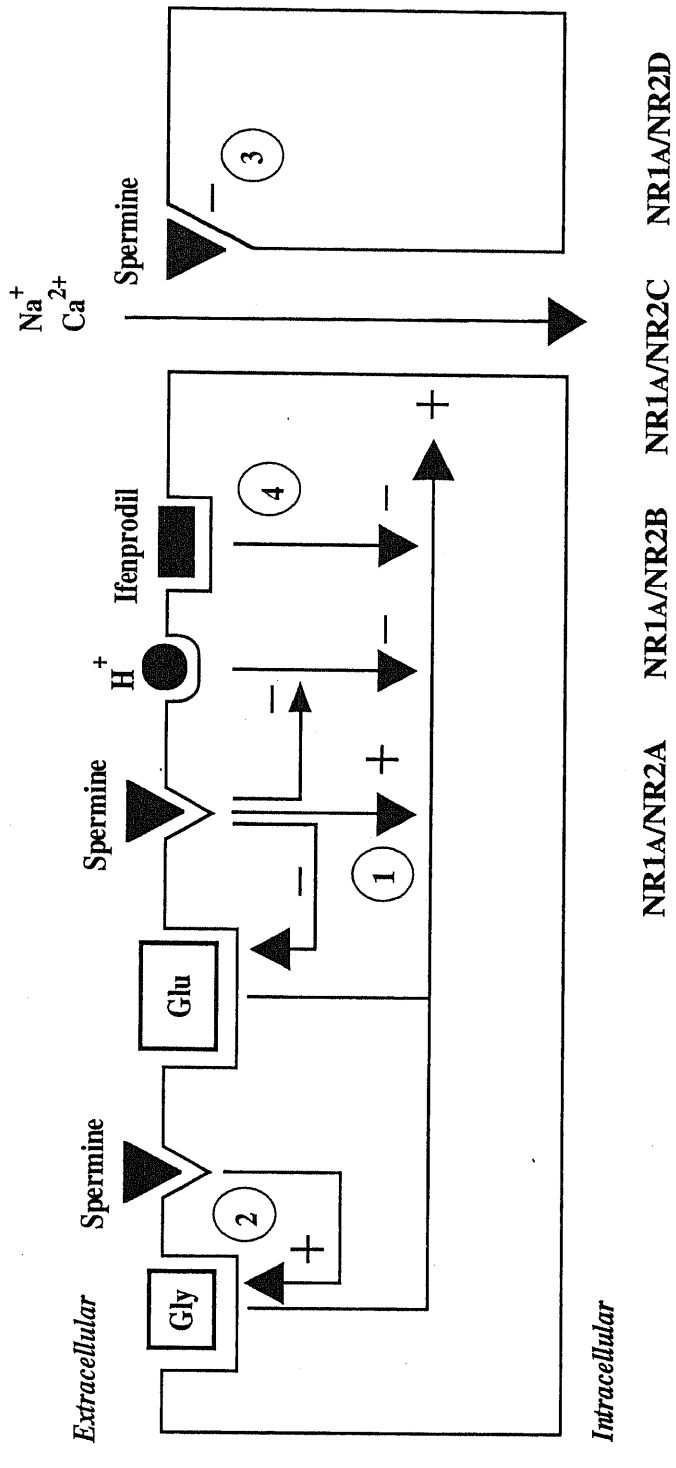


Fig.1. Model of NMDA receptor.



| Effects of spermine | Effects of spermine | | | | |
|-------------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|---|
| | NR1A/NR2A | NR1A/NR2B | NR1A/NR2C | NR1A/NR2D | |
| 1. Glycine-independent stimulation | — | + | — | — | — |
| 2. Glycine-dependent stimulation | + | + | — | — | — |
| 3. Voltage-dependent inhibition | + | + | — | — | — |
| 4. Decrease in glutamate affinity | — | + | — | — | — |
| 5. Relative affinity for ifenprodil | — | + | — | — | — |

Fig.2. Effects of spermine on NMDA receptor.

により NMDA 受容体、AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) 受容体、Kainate 受容体に大別されている。AMPA 受容体、Kainate 受容体は Na^+ 、 K^+ を透過するのに対し、NMDA 受容体は Na^+ 、 K^+ 以外に Ca^{2+} にも透過性を示し、その活性化にはグルタミン酸の他グリシンを必要とする。長期増強において、後シナプス側での Ca^{2+} -Calmodulin dependent kinase II の活性化が必須であること (28) から Ca^{2+} 透過性を示す NMDA 受容体の脳機能における重要性が示唆される。NMDA 受容体は NR1 サブユニットと NR2 サブユニットからなるヘテロテトラマーであり (29)、NR1 サブユニットは 8 種類 (NR1A~H) のスプライシングバリエーションが存在し、NR2 サブユニットは NR2A~NR2D の 4 つの遺伝子が存在する (27、30-33)。NR1 サブユニットは脳全体に発現するが、NR2 サブユニットの発現は脳部位によって異なっており、NR2A、NR2B は比較的広範囲に発現する (34)。それに対して、NR2C は小脳の顆粒細胞で強く発現し、NR2D は幼弱期に発現するが成体ではほとんど発現しない。各々のサブユニットの機能に関しては、標的遺伝子破壊法 (35、36) により解析されており、NR1 サブユニットや NR2B サブユニットのノックアウトマウスは生後すぐ死亡する (37、38)。また、海馬の CA1 領域のみのコンディショナルノックアウトでは NR1 サブユニットや NR2B サブユニットのミュータントとともに海馬の CA1 領域で認められる NMDA 受容体依存的な長期増強が起こらず、記憶形成の障害が生じる (39、40)。そのため、NMDA 受容体は生体にとって必須であるとともに、脳における記憶の形成に深く関わっていることが示唆されている。本受容体はポリアミンやプロトン以外に多くのアゴニスト、アンタゴニストの存在が知られており、さまざまな活性調節を受ける (41-44)。その中でもスペルミンは NMDA 受容体に対し、①グリシン非依存性の促進、②グリシン依存性の促進、③電位依存性の阻害、④グルタミン酸の親和性の低下の 4 つの活性調節を行うことが知られており (45)、NR1A/NR2A 受容体では②、③の効果が認められ、NR1A/NR2B 受容体では①~④すべてのスペルミンの効果が認められる (Fig.2)。また、ポリアミンの結合部位は NR1A サブユニットに存在することが示唆されており、すでに本研究室で、スペルミンのグリシン非依存性の促進効果に関与するアミノ酸残基として、N 末端領域に存在する NR1A E342、M3-M4 領域 D669、チャンネル孔を形成している M2 領域 NR1A N616 の他、W608、W611、Y647 があり、スペルミンによる電位依存性の阻害に NR1A W563、N616、E621、D669 が関与していることを明らかにしている。本研究ではポリアミンの多様な調節機能のうち、ポリアミンが NMDA 受容体の活性を促進する生理的意義を明らかにすることを最終目的とし、1) NMDA 受容体のスペルミン結合部位の同定 2) アミノグリコシド系抗生物質の NMDA 受容体に及ぼす影響 3) 神経系におけるポリアミン輸送の 3 点について検討した。

第 I 章 NMDA 受容体のスペルミン結合部位の同定

NMDA 受容体はスペルミンやプロトンなどの他に多くの内因性、外因性のリガンドにより活性調節を受ける。スペルミンは NMDA 受容体に対し、複数の異なった促進効果を示す。そのうち代表的なのがグルタミン酸とグリシンが飽和濃度で存在している際に認められるグリシン非依存的な促進効果 (46) である。組換え NMDA 受容体を用いた際、NR2B サブユニットと exon-5 を欠いた NR1 サブユニットのスプライシング・バリエーションの組み合わせでのみグリシン非依存的な促進効果が認められる (31、47、48)。また、NMDA 受容体は pH 感受性であり、生理的条件下で受容体活性を測定した際、プロトンによる活性阻害を受け、pH8.5 での受容体活性を 100% とし、pH IC₅₀ は 7.3-7.5 程度である。スペルミンの促進効果も pH 感受性で、生理的条件下で受容体活性を測定した際、プロトンによる阻害をスペルミンが結合し解除することで、促進効果が認められると考えられる (49)。この考えはスペルミンの促進効果の減少している NR1 サブユニットの変異体の多くで、プロトンの阻害の減少が認められていることから支持されている (50-52)。またスペルミンやプロトンによる効果は exon-5 を含む NR1 バリエーションでは認められないことから、exon-5 自身がポリアミンのような役割をしているのではないかと考えられている (32、49)。

イフェンプロジルは NR2B 特異的な NMDA 受容体のアンタゴニスト (53、54) で、NMDA 受容体活性を 80-90% 程度阻害する。イフェンプロジルはポリアミン部位に働く open channel blocker (53、55、56) で、この阻害効果も pH 感受性 (57) であり、現在までに我々が報告したスペルミンと pH に感受性を示す細胞外の N 末端領域、M3-M4 領域や M2 領域のアミノ酸残基の変異体はイフェンプロジルの阻害効果の減少が認められることから、これらスペルミン、プロトン、イフェンプロジルは同一の部位に作用して働くと考えられている (48、51、52)。

本研究では当研究室で既に明らかになっている大腸菌のスペルミジン輸送系の基質結合タンパク質である PotD と NR1 サブユニットのアミノ酸配列のホモロジー検索の結果や PotD へのスペルミジンの結合に酸性アミノ酸の関与が最も大きかったこと (58)、また、電気生理学的な実験において、細胞外よりポリアミンが NMDA 受容体に対して作用することから、NMDA 受容体の細胞外領域に存在する N 末端と M3-M4 領域の酸性アミノ酸残基がスペルミンの結合に関与すると考え、これらの酸性アミノ酸残基の変異体を作製して、結合部位の同定を試みた (31)。

I-1. 材料と方法

(1) NMDA クローンと site-directed mutagenesis

本研究で用いた NR1 クローンは exon-5 の 21 アミノ酸を欠いた NR1A バリエーションを用いた。このクローンは中西重忠博士（京都大学 医学部）より譲渡して頂いた。NR2A と NR2B クローンは P.H. Seeburg（Center for Molecular Biology, University of Heidelberg, Germany）より譲渡して頂いた。変異体は M13 ファージシステムを用いた site-directed mutagenesis を行い作製した（59、60）。site-directed mutagenesis に使用したオリゴヌクレオチド プライマーは以下に示す。また、変異の有無については、DNA sequencing を行なうことで確認した。

primer (5' → 3')

| NR1A | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|
| D23N | GAT | CTT | GGG | GTT | GCA | GGC | GGC | GC | | C→T |
| E39Q | GAA | CAT | CTG | TTG | ATG | CTT | GCG | CG | | C→G |
| E44Q | GTT | TAC | TGC | CTG | GCG | GAA | CAT | CT | | C→G |
| E80Q | GAT | GAG | GTC | CTG | ACA | CAC | TGA | CA | | C→G |
| D81N | AGA | GAT | GAG | GTT | CTC | ACA | CAC | TG | | C→T |
| D100N | AGT | GAA | GTG | GTT | GTT | GGG | AGT | AG | | C→T |
| F102L | GGT | GGG | AGT | GAG | GTG | GTC | GTT | GG | | A→G |
| S108A | AGC | TGT | GTA | GGC | GAC | AGG | GGT | GG | | A→C |
| Y109A | GAA | GCC | AGC | TGT | GGC | GGA | GAC | AGG | GGT G | TA→GC |
| Y109F | AGC | CAG | CTG | TGA | AGG | AGA | CAG | GG | | T→A |
| Y109L | AGA | AGC | CAG | CTG | TTA | AGG | AGA | CAG | GGG T | GT→TA |
| Y109S | AGC | CAG | CTG | TGG | AGG | AGA | CAG | GG | | T→G |
| Y109V | GAA | GCC | AGC | TGT | GAC | GGA | GAC | AGG | GGT G | TA→AC |
| Y109W | AGA | AGC | CAG | CTG | TCC | AGG | AGA | CAG | GGG T | GT→CC |
| T110A | GAA | GCC | AGC | TGC | GTA | GAG | GAC | AG | | A→G |
| F113L | GAT | TCT | GTA | GAG | GCC | AGC | TGT | GT | | A→G |
| Y114A | GAC | AGG | GAT | TCT | GGC | GAA | GCC | AGC | TGT G | TA→GC |
| Y114F | CAG | GGA | TTC | TGA | AGA | AGC | CAG | CT | | T→A |
| Y114L | GGA | CAG | GGA | TTC | TTA | AGA | AGC | CAG | CTG T | GT→TA |
| S126A | AGA | GTA | GAT | GGC | CAT | TCG | GGT | AG | | A→C |
| Y128A | ACT | CTT | GTC | AGA | GGC | GAT | GGA | CAT | TCG G | TA→GC |
| Y128L | ACT | CTT | GTC | AGA | GAG | GAT | GGA | CAT | TCG G | TA→AG |
| S129A | ACT | CTT | GTC | AGC | GTA | GAT | GGA | CA | | A→C |
| D130A | GGA | TAC | TCT | TGG | CAG | AGT | AGA | TG | | T→G |
| D130E | TGG | ATA | CTC | TTT | TCA | GAG | TAG | AT | | G→T |
| D130N | GAG | ACT | CTT | GTT | AGA | GTA | GAT | GG | | C→T |
| K131L | CAG | GTG | GAT | ACT | CAG | GTC | AGA | GTA | GAT G | TT→AG |
| S132A | ACT | CAG | GTG | GAT | AGC | CTT | GTC | AGA | GTA G | CT→GC |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| F137L | CGT | GCG | AAG | GAG | ACT | CAG | GTG | GA | | | | A→G |
| Y144L | TGG | ACT | GGT | GGG | ATA | AGG | GCG | GCA | CCG | T | | GT→TA |
| W151L | TCA | TCT | CAA | ACA | AGA | CGC | TGG | AC | | | | C→A |
| E153Q | TCG | CAT | CAT | CTG | AAA | CCA | GAC | GC | | | | C→G |
| D169N | CTC | GTG | GTC | GTT | GCT | GAC | CAG | CA | | | | C→T |
| D170A | GTC | CCT | CGT | GGG | CGT | CGC | TGA | CC | | | | T→G |
| D170E | CGT | CCC | TCG | TGC | TCG | TCG | CTG | AC | | | | G→C |
| D170N | TCC | CTC | GTG | GTT | GTC | GCT | GAC | CA | | | | C→T |
| E172Q | TGC | CCG | TCC | CTG | GTG | GTC | GTC | GC | | | | C→G |
| E181A | CTC | CAG | CAA | CGT | CGC | CAA | GCG | CTT | CTG | | | T→G |
| E181D | CTC | CAG | CAA | CGT | GTC | CAA | GCG | CTT | CTG | | | C→G |
| E181Q | CAG | CAA | CGT | CTG | CAA | GCG | CTT | CT | | | | C→G |
| E185A | ACT | CCC | GTT | CCG | CCA | GCA | ACG | TC | | | | T→G |
| E185D | GAC | TCC | CGT | TCG | TCC | AGC | AAC | GT | | | | C→G |
| E185Q | CTC | CCG | TTC | CTG | CAG | CAA | CGT | CT | | | | C→G |
| E186A | TGG | ACT | CCC | GTG | CCT | CCA | GCA | AC | | | | T→G |
| E186D | TTG | GAC | TCC | CGG | TCC | TCC | AGC | AA | | | | T→G |
| E186Q | GGA | CTC | CCG | TTG | CTC | CAG | CAA | CG | | | | C→G |
| R187A | CTC | TGC | CTT | GGA | CTC | CGC | TTC | CTC | CAG | CAA | CGT | |
| | | | | | | | | | | | | CG→GC |
| R187E | CTC | TGC | CTT | GGA | CTC | CTC | TTC | CTC | CAG | CAA | CGT | |
| | | | | | | | | | | | | CG→TC |
| E188Q | TGC | CTT | GGA | CTG | CCG | TTC | CTC | CA | | | | C→G |
| E192Q | CAG | CAC | CTT | CTG | TGC | CTT | GGA | CT | | | | C→G |
| D198A | TGG | TTC | CTG | GGG | CAA | ACT | GCA | GC | | | | T→G |
| D198E | TTG | GTT | CCT | GGC | TCA | AAC | TGC | AG | | | | G→C |
| D198N | GGT | TCC | TGG | GTT | AAA | CTG | CAG | CA | | | | C→T |
| E210Q | TTC | CCG | GGC | CTG | CAT | CAG | CAG | AG | | | | C→G |
| E213Q | GGC | CTC | CAG | TTG | CCG | GGC | CTC | CA | | | | C→G |
| E215Q | GAC | CCG | GGC | CTG | CAG | TTC | CCG | GG | | | | C→G |
| D225N | AGC | GTC | GTC | CTG | GCT | TGC | AGA | AA | | | | C→G |
| D226N | GGC | AGC | GTC | GTT | CTC | GCT | TGC | AG | | | | C→T |
| D227N | TGT | GGC | AGC | GTT | GTC | CTC | GCT | TG | | | | C→T |
| E251Q | GAT | CTC | GCG | TTG | CCC | GAC | CAG | CC | | | | C→G |
| E253Q | CCC | AGA | GAT | CTG | GCG | TTC | CCC | GA | | | | C→G |
| D264N | GAT | GAT | GCC | ATT | AGG | AGC | GTA | GC | | | | C→T |
| E277Q | GTG | GGC | TAG | CTG | ATT | CTT | GCC | AT | | | | C→G |
| D283N | GCC | CAC | GGC | GTT | ACT | GAT | GTG | GG | | | | C→T |
| E294Q | CTC | TAG | GAG | TTG | GTG | AAC | TGC | CT | | | | C→G |
| E297A | GAT | ATT | CTC | CTT | CGC | TAG | GAG | TTC | GTG | | | T→G |
| E297D | GAT | ATT | CTC | CTT | GTC | TAG | GAG | TTC | GTG | | | C→G |
| E297Q | ATT | CTC | CTT | CTG | TAG | GAG | TTC | GT | | | | C→G |

| | | |
|-------|--|-----|
| E299Q | AGT GAT ATT CTG CTT CTC TAG GA | C→G |
| D303A | ACC CCG CGG TGG GGC AGT GAT ATT CTC | T→G |
| D303E | ACC CCG CGG TGG <u>CTC</u> AGT GAT ATT CTC | G→C |
| D303N | CCG CGG TGG <u>GTT</u> AGT GAT ATT CT | C→T |
| E406N | ACG AAG GGC <u>TGT</u> TGG TGG ATT | C→G |
| D417N | CAT GTC CCA <u>TTA</u> CTC ATT GTG | C→T |
| E422Q | GTG AAC TCC <u>TGT</u> TTG CAT GTC | C→G |
| E423Q | ACT GTG AAC <u>TGC</u> TCT TTG CAT | C→G |
| D429N | TTC ACT GGG <u>TTA</u> CCA TTG ACT | C→T |
| D441N | GGG GAC GTG <u>TTA</u> TTA GGC CCC | C→T |
| D461N | ATG AGC AGG <u>TTT</u> ATG CAG AAG | C→T |
| E475Q | AGG TGC ACC <u>TGA</u> TAG GTA AAA | C→G |
| D481N | AAC TTG CCA <u>TTT</u> GCC ACC AGG | C→T |
| E488Q | TTT ACC CGC <u>TGC</u> TGT GTG CCA | C→G |
| E497Q | CCG TTC CAC <u>TGC</u> TTT TTG TTG | C→G |
| E504Q | CTG AGT AGC <u>TGG</u> CCC ATC ATT | C→G |
| D511N | ACA ATC ATG <u>TTC</u> GCT TGG CCA | C→T |
| E522Q | TGC GCA CGC <u>TGA</u> TTG TTG ATG | C→G |

NR2B

| | | |
|-------|---------------------------------------|-----|
| D136N | TGA TAA TGG <u>CGA</u> ATA AGG ATG AG | C→A |
| E191A | CAG TAC CAT <u>CGC</u> GAA CAG CTT CG | A→C |
| E191D | AGT ACC ATC <u>GAC</u> AAC AGC TTC GT | G→C |
| E191Q | GCA GTA CCA <u>TCC</u> AGA ACA GCT TC | G→C |
| E198Q | TCG TGG GCT <u>GGC</u> AGC TCG AGG AA | G→C |
| E200Q | GCT GGG AGC <u>TCC</u> AGG AAG TCC TC | G→C |
| E201A | GGA GCT CGA <u>GGC</u> AGT CCT CCT GC | A→C |
| E201D | GAG CTC GAG <u>GAC</u> GTC CTC CTG CT | A→C |
| E201Q | GGG AGC TCC <u>AGC</u> AAG TCC TCC TG | G→C |

(2) *Xenopus* の卵母細胞での NMDA受容体の発現と電位固定法

capped cRNA の合成及び卵母細胞の調製は Williams らの方法に従った (47, 53, 54)。卵母細胞に対して、NR1 と NR2 cRNA の比が 1 : 5 になるように注入した (NR1 0.1 ~ 4 ng, NR2 0.5 ~ 20 ng)。電流の測定には GeneClamp 500 amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) または OC-725 amplifier (Warner Instruments, Hamden, CT) を用いた双極電位固定法により測定した (47, 53)。測定には Ba²⁺-SOS (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM BaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.5) を使用し、多くの場合、測定時に K⁺-BAPTA (1個の卵母細胞につき 40 mM K⁺-BAPTA を 100 nl) を卵母細胞に注入した後、測定を行なった。

I-2. 結果

(1) グリシン非依存性スペルミン促進効果に関与するアミノ酸残基の同定

NR1A/NR2B 受容体で認められるグリシン非依存性スペルミン促進効果に NR1A サブユニット上の細胞外のN末端領域と M3~M4 領域の酸性アミノ酸残基が関与すると考え、これらの領域のグルタミン酸やアスパラギン酸残基について、グルタミンやアスパラギンに置換した変異体を作製し、変異 NMDA 受容体をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、10 μ M グルタミン酸、10 μ M グリシン存在下で認められる100 μ M スペルミンの促進効果について、-20 mVの固定電位で測定した。その際、当研究室で既に明らかにしているスペルミンによる促進効果に関与するN末端領域 NR1A E342 近辺の8個の酸性アミノ酸残基及び促進と阻害に関与するM3~M4領域 NR1A D669 近辺の15個の酸性アミノ酸残基については省略した。N末端領域の exon-5 挿入部位近くに存在するD170N、E181Q、E185Q やE297Q、D303N 及び M3~M4 領域 D789N の変異体において、スペルミンの促進効果の減少が認められた (Fig. I-1)。D511N、D765N 変異体ではスペルミンによる促進効果の増大が認められたが、ポリアミンの促進効果がpH依存性であり、これらの変異体でpH感受性が上昇したことによって生じたと考えられる。スペルミンの促進効果への関与が認められた NR1A D170、E181、E185、E297、D303 に関して、アラニンや異なる酸性アミノ酸残基に置換した変異体を作製して検討を行なった。その結果、E181、E185 はアラニンに置換した変異体においてもスペルミンの促進効果の減少が認められた (Fig. I-2B)。さらに、アスパラギン酸残基に置換した変異体においてスペルミンの促進効果に影響を与えなかったことから、これら E181、E185 はスペルミンの促進効果に強く関与していると考えられ、またスペルミンの促進効果にはこの位置が酸性アミノ酸残基であることが重要であると示唆された。他の D170、E297、D303 はアラニンに置換した変異体においてスペルミンの促進効果に影響を与えなかったことから、スペルミンの促進効果に強く関与していないと考えた。さらに、スペルミンの促進効果に関与が認められた NR1A E181、E185 に対応する NR2B サブユニットの酸性アミノ酸残基について検討を行なった結果、NR2B E191、E201 がスペルミンの促進効果に関与するアミノ酸残基であることが明らかとなった。次に、プロトンによる受容体活性の阻害はポリアミン結合部位に作用する (49) ことが知られていることから、wild type 及びスペルミンの促進効果に関与すると考えられるアミノ酸残基の変異体について、pH 8.5の時の受容体活性を100%とした pH IC₅₀ を測定した (Fig. I-2C)。スペルミンの促進効果に関与が認められた NR1A E181、E185、NR2B E191、E201 の変異体において、wild type に比べプロトンによる阻害が低下したことから、これらのアミノ酸残基はスペルミンの促進効果とプロトンの阻害の両方に関与するアミノ酸残基であると考えられた。

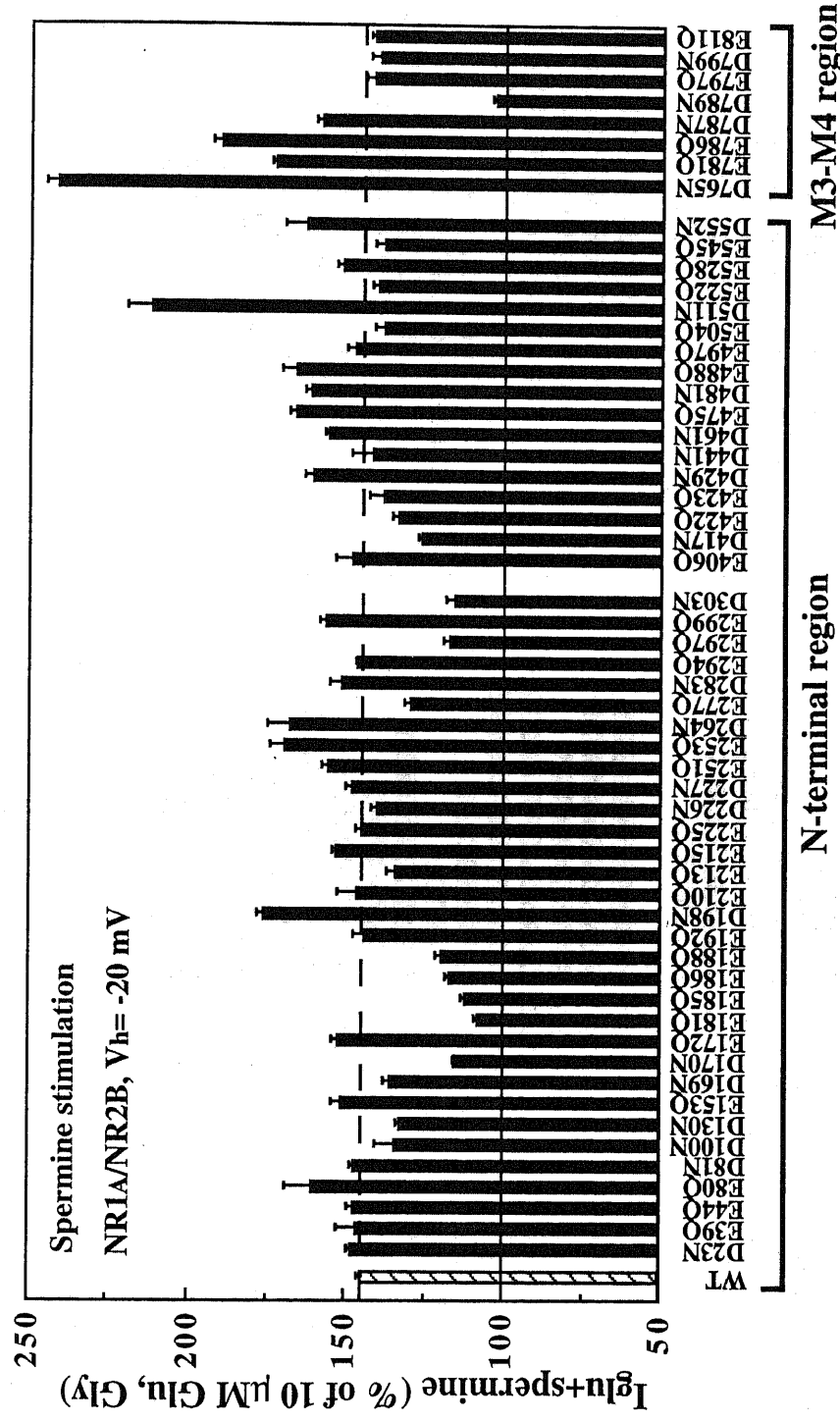


Fig.1-1. Effects of mutants in the N-terminal and M3-M4 regions of NR1A.

The effects of 100 μM spermine were determined in oocytes expressing NR1A/NR2B receptors with wild-type or mutant NR1 subunits, voltage-clamped at -20 mV and activated by 10 μM glutamate and glycine. Values are mean ± S.E.M. from 4 to 14 oocytes each mutant and from 80 to 131 oocytes for wild-type receptor, which were studied in all batches of oocytes.

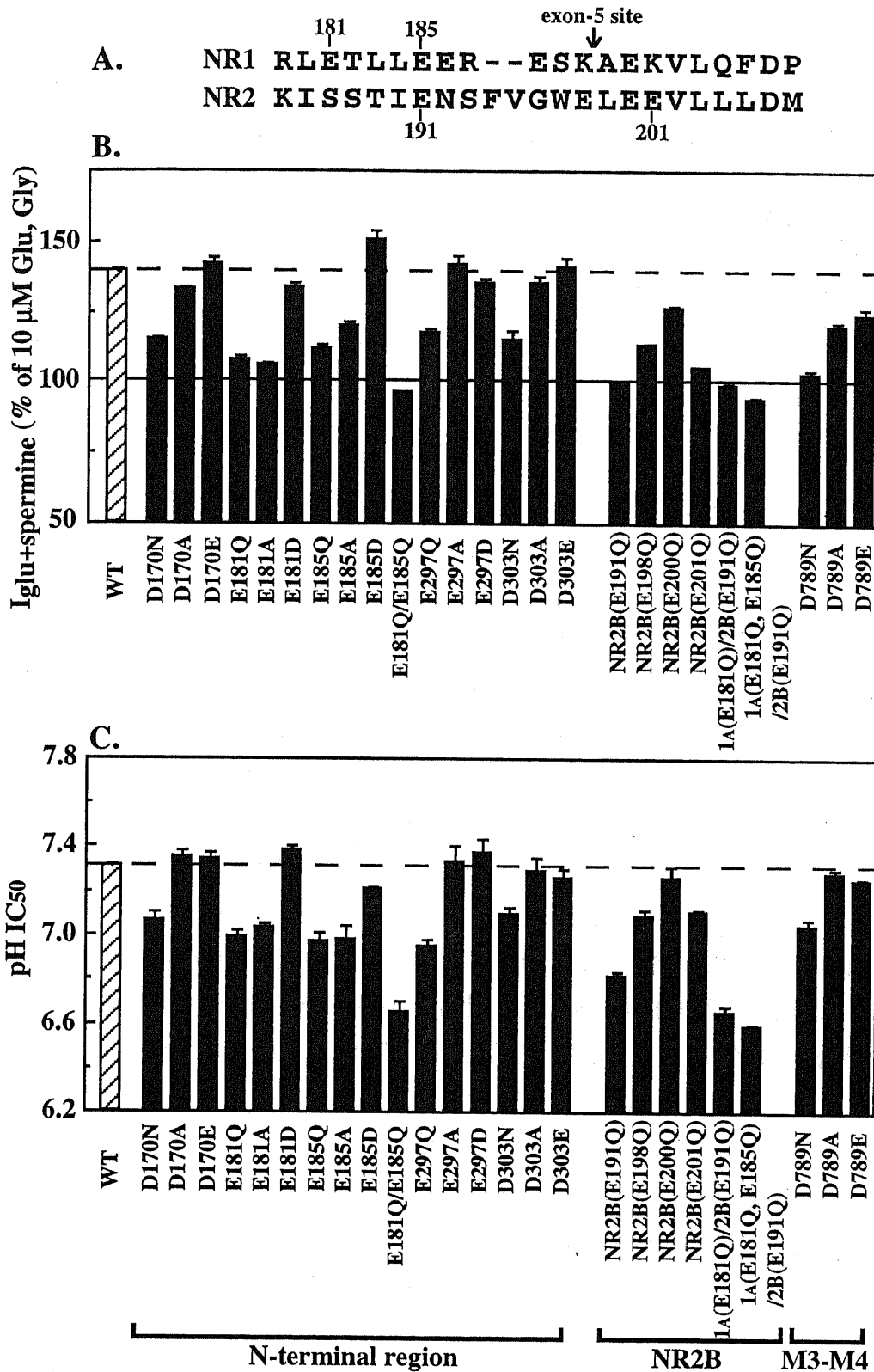


Fig. I-2. Spermine stimulation and proton inhibition at mutant NR1A/NR2B receptor.

A. Sequences of NR1 and NR2B that flank residues NR1 (E181) and NR1 (E185). B. Spermine stimulation was measured using 100 μ M spermine, with 10 μ M glutamate and glycine, in oocytes expressing NR1A/NR2B receptors and voltage-clamped at -20 mV. C. The pH IC₅₀ was determined by measuring responses to glutamate (10 μ M; with 10 μ M glycine) at different extracellular pH. Values are mean \pm S.E.M. from 4 to 14 oocytes each mutant and from 80 to 131 oocytes for wild-type receptor, which were studied in all batches of oocytes.

(2) 電位依存性スペルミンの阻害効果に関与するアミノ酸残基の同定

(1) で作製した NR1A サブユニットの変異体を NR2A サブユニットとの組み合わせで卵母細胞に発現させ、10 μ M グルタミン酸、10 μ M グリシン存在下で認められる 10 μ M スペルミンの阻害効果について、-100 mV の固定電位で測定した。N 末端領域 D198N、M3~M4 領域 E781Q の変異体において、スペルミンによる阻害効果の減少が認められた (Fig. I-3)。しかしながら、これらのアミノ酸残基についてアラニンや異なる酸性アミノ酸残基に置換した変異体において、スペルミンの阻害効果に影響を及ぼさなかったことから、スペルミンの阻害効果には強く関与していないと考えた (Fig. I-3)。

(3) イフェンプロジルによる阻害に関与するアミノ酸残基の同定

(1) で作製した NR1A サブユニットの変異体を NR2B サブユニットとの組み合わせで卵母細胞に発現させ、10 μ M グルタミン酸、10 μ M グリシン存在下で認められる 1 μ M イフェンプロジルの阻害効果について、-20 mV の固定電位で測定した。スペルミンの促進効果への関与が認められた変異体においてイフェンプロジルによる阻害の若干の減少が認められたが、これは以前明らかになっている NR1A E342Q や NR1A D669N 変異体での 1 μ M イフェンプロジルの阻害がそれぞれ 50%、30% 程度であるのに比べ非常に弱い阻害の減少であった。さらに NR1A D130N 変異体において、スペルミンの促進効果にあまり関与しないにも係わらず、イフェンプロジルの阻害が 100% 消失していた (Fig. I-4)。

NR1A D130N 変異体において、イフェンプロジルの阻害効果の消失が認められたことから、この近辺の芳香族アミノ酸残基を中心に変異体を作製して検討した。その結果、NR1A S108A、Y109L、F113L、Y114L、Y128A、D130N 変異体において、イフェンプロジルの阻害の減少が認められた (Fig. I-5B)。また、これらの変異体はスペルミンの促進効果や pH IC50 に影響を与えなかったことから、イフェンプロジル特異的に作用する部位であると考えられる (Fig. I-5C、D)。NR1A S129A、F137L 変異体において、スペルミンの促進効果の増大が認められるが、これは pH 感受性の上昇によって生じたと考えられた (Fig. I-5C、D)。

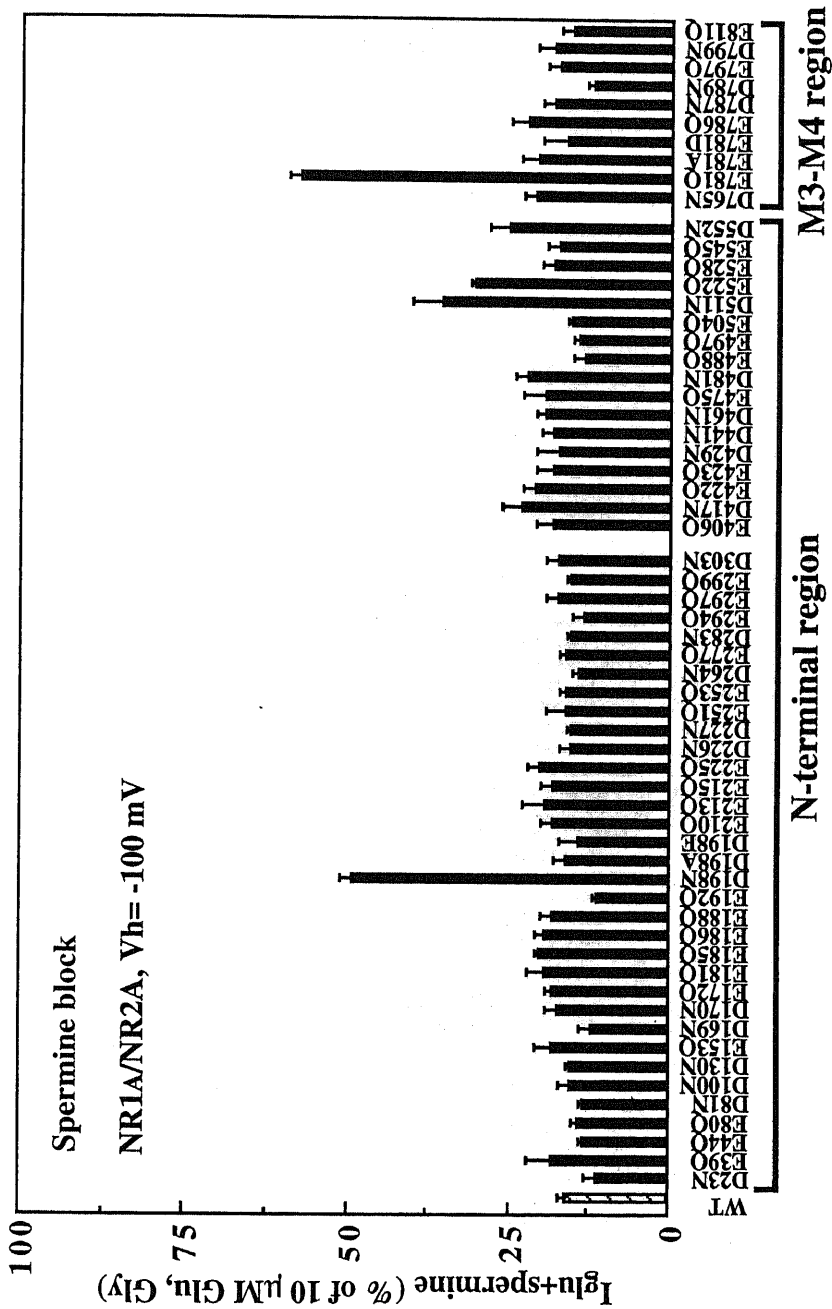


Fig.I-3. Effects of mutations in the N-terminal and M3-M4 regions of NR1A.
 Block by 10 μM spermine was measured in oocytes expressing NR1A/NR2A receptors voltage-clamped at -100 mV. Currents measured in the presence of spermine (I_{glu+spermine}) are expressed as a percentage of the control current (I_{glu}). Values are mean ± S.E.M. from 4 to 14 oocytes each mutant and from 80 to 131 oocytes for wild-type receptor, which were studied in all batches of oocytes.

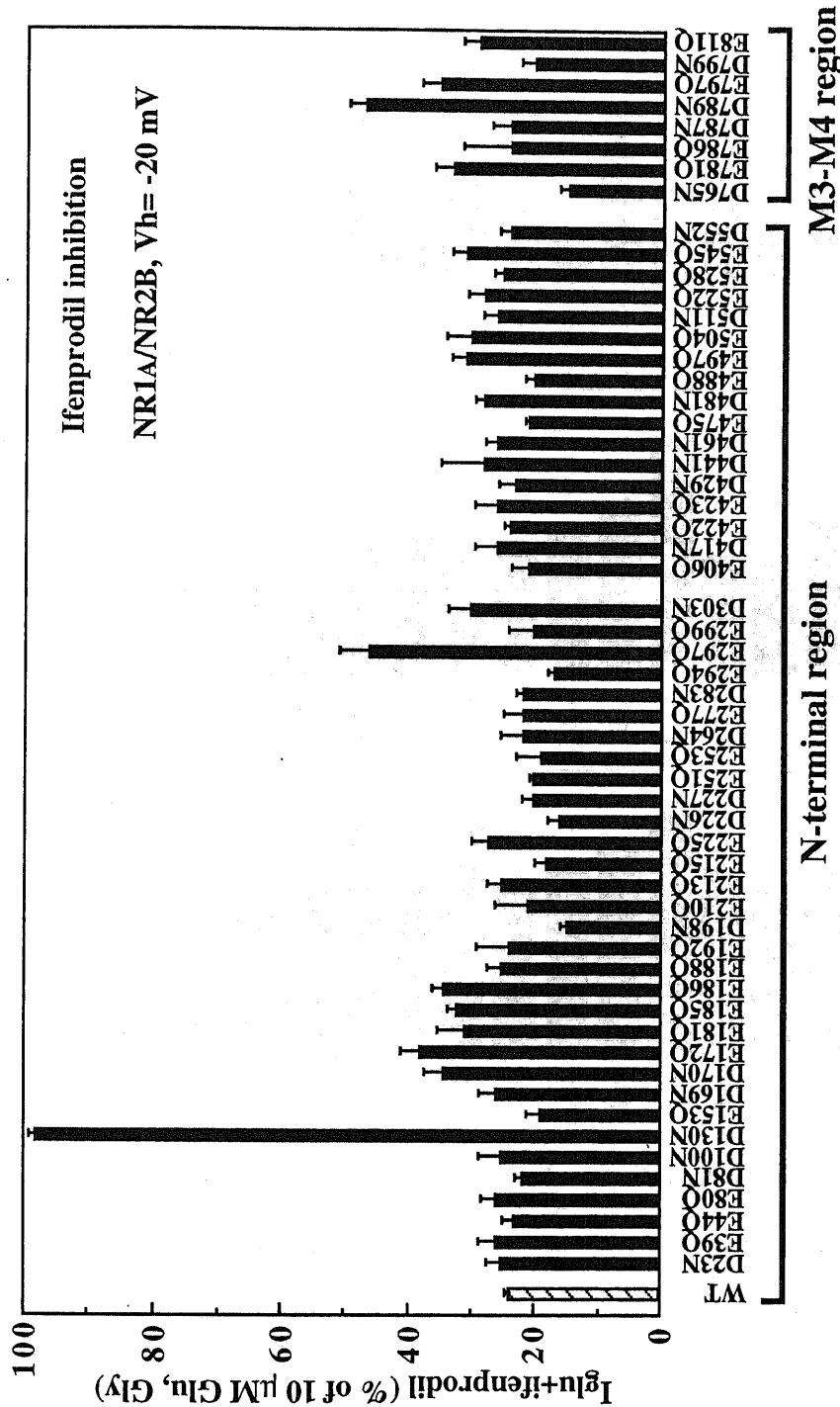


Fig. I-4. Effects of mutations in the N-terminal and M3-M4 regions of NR1A.

The effects of 1 μ M ifenprodil were measured in oocytes expressing NR1A/NR2B receptors voltage-clamped at -20 mV. Currents measured in the presence of ifenprodil are expressed as a percentage of the control current. Values are mean \pm S.E.M. from 4 to 14 oocytes each mutant and from 80 to 131 oocytes for wild-type receptor, which were studied in all batches of oocytes.

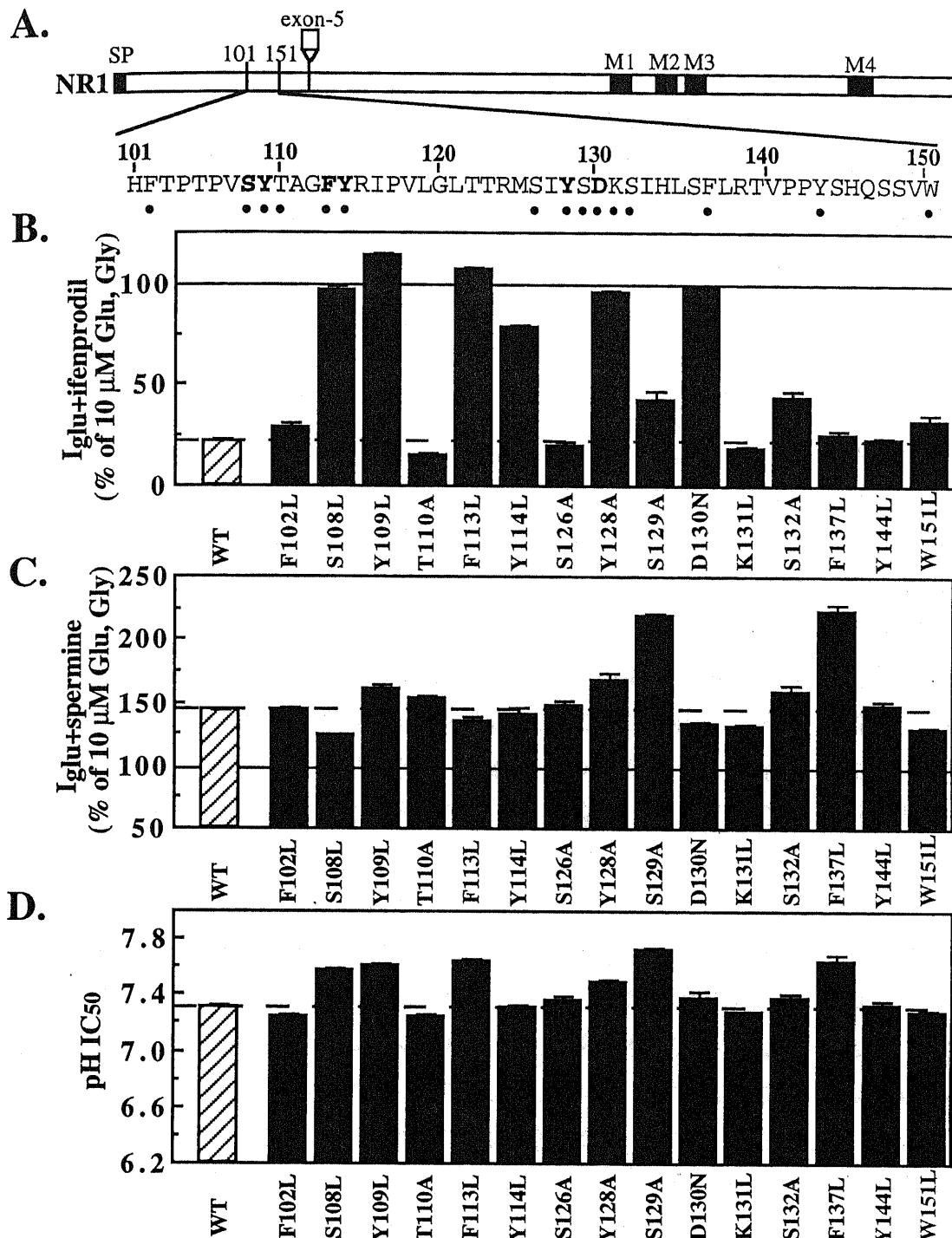


Fig. I-5. Ifenprodil inhibition, spermine stimulation and proton inhibition at mutant NR1A/NR2B receptor.

A, Schematic of the NR1 subunit showing the relative positions of the exon-5 splice site, the M1-M4 membrane spanning regions, and the region between amino acids 101 and 151 in which mutants were made. SP, signal peptide. The amino acid sequence in this region is shown below the schematic. The positions at which mutations were made are indicated by a circle, and residues at which mutations have a pronounced effect on ifenprodil sensitivity are shown in bold. B, The effects of 1 μ M ifenprodil were measured in oocytes expressing NR1A/NR2B receptors with wild-type or mutant NR1 subunits, activated by 10 μ M glutamate and glycine, and voltage-clamped at -20 mV. C, The effects of 100 μ M spermine were determined in oocytes voltage-clamped at -20 mV and activated by 10 μ M glutamate and glycine. D, The pH IC₅₀ was determined by measuring responses to glutamate (10 μ M; with 10 μ M glycine) at different extracellular pH.

1-3. 結論

スペルミンの促進効果に関与する細胞外のアミノ酸残基として、既に明らかになっているN末端領域 NR1A E342、M3-M4 領域の D669 以外に新たに NR1A E181、E185、NR2B E191、E201 がスペルミンの促進効果に関与するアミノ酸残基であることが明らかとなった (Fig. I-6)。また、これらのアミノ酸残基の変異体においてもプロトンによる阻害の減少が認められたことから、NMDA 受容体の細胞外領域において、スペルミンによる促進効果に関与するアミノ酸残基とプロトンによる阻害に関与するアミノ酸残基は同一であると考えられる。このようにスペルミンの感受性が変化した変異体で pH の感受性も変化していたことは、スペルミンの促進効果はプロトンの阻害を解除することを伴って生じる考えを支持するものであった (49)。また、 Zn^{2+} は NR1A/NR2A 受容体特異的なアンタゴニストであるが、スペルミンと pH の感受性を変えた変異 NR1A/NR2B 受容体では Zn^{2+} による阻害を受ける (50)。NR1A E181、E342 などはスペルミン、プロトンだけでなく Zn^{2+} の感受性にも関与することから、細胞外からのリガンドなどによる活性調節に重要な部位であると考えられる。また、NMDA 受容体の細胞外領域において NR1A D669 以外にスペルミンの阻害効果に酸性アミノ酸残基の関与は認められなかった。現在までに明らかになっているスペルミンの阻害効果に酸性アミノ酸残基は比較的チャンネル孔の内部の方に存在していることから、過分極時にはスペルミンが NMDA 受容体のチャンネルの内部に入り込んで阻害すると考えられた。

イフェンプロジルは NR2B サブユニットを含む NMDA 受容体の特異的なアンタゴニストである (53、54)。イフェンプロジルの結合部位やサブユニット特異性に対する知見は得られていない。NR2B R337 の変異体において、イフェンプロジルの阻害効果が減少することが報告されている。しかし、NR1A サブユニットのみから成る受容体において、イフェンプロジルの阻害がみられることから、NR2B R337 は NR1A/NR2B 受容体と NR1A/NR2A 受容体の感受性の違いに関与する残基であると考えられる (61)。本研究において、N末端領域 NR1A S108、Y109、F113、Y114、Y128、D130 はイフェンプロジルの阻害効果に関与するアミノ酸残基であることが明らかになった。イフェンプロジルの感受性に関与するアミノ酸残基がこれらの領域に集中して存在することから、これらのいくつかのアミノ酸残基はイフェンプロジルの結合に関与していると考えられた。現在までに我々が明らかにしてきたイフェンプロジルの阻害効果に関与するアミノ酸残基はスペルミンの促進に関与するアミノ酸残基と同一であったが、本研究で明らかになったこれらアミノ酸残基の変異体はスペルミンの促進やプロトンの阻害には影響を与えなかったため、イフェンプロジル特異的なアミノ酸残基であることが示唆された。

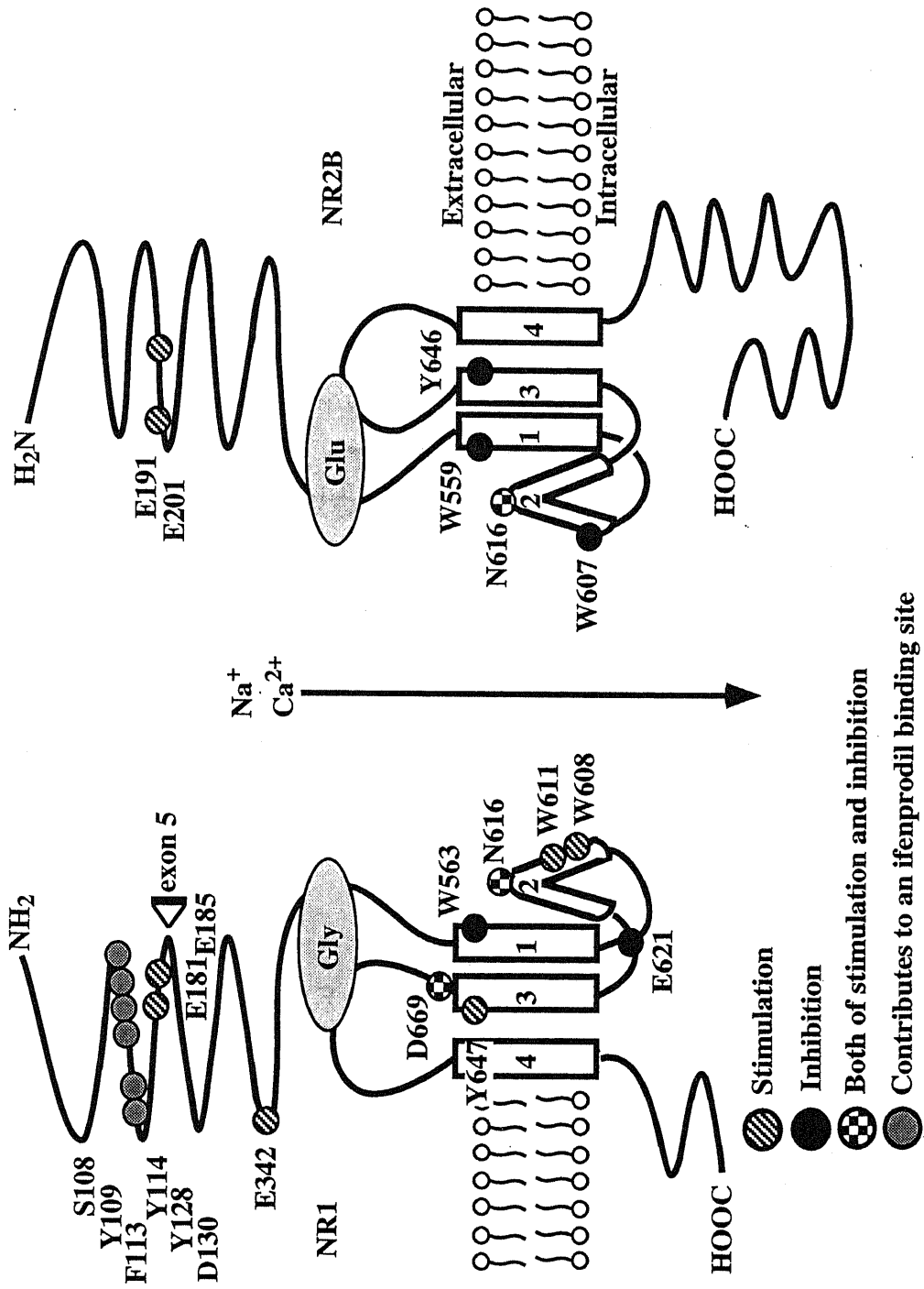


Fig.I-6. New model of NMDA receptor.

第Ⅱ章 アミノグリコシド系抗生物質のNMDA 受容体に及ぼす影響

聴覚の受容と伝達において、音は内耳の有毛細胞で電気信号に変換され、シナプスを介して求心性神経に伝達される。一方、中枢神経系からは遠心性の神経支配が行われ、有毛細胞、そして有毛細胞から求心性神経繊維へ信号伝達をするシナプスを制御しており、このシナプスにおいて神経伝達物質はグルタミン酸が使われ、グルタミン酸受容体が音の伝達に関与している(62)。一方、ネオマイシンやカナマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質はアミノ酸とアミノサイクリトールがグリコシド結合した構造を有する一群の抗生物質で、強い抗菌作用を示すが、一方で聴覚障害などの副作用を起こすことからその使用が限られている(63、64)。アミノグリコシド系抗生物質による聴覚障害はNMDA受容体の過剰興奮により、蝸牛の求心性神経繊維とシナプスを形成する内有毛細胞、遠心性神経細胞繊維とシナプスを形成する外有毛細胞が破壊されることによって起こると考えられており(65)、またネオマイシンやカナマイシンがNMDA受容体のアゴニストとして働くことが報告されている(66-68)。さらに、これらのアミノグリコシド系抗生物質によって引き起こされた聴覚障害が、NMDA受容体のポリアミン結合部位に作用して受容体活性を阻害するイフェンプロジルによって緩和されるという報告がなされている(65)。このため、ネオマイシン、パロモマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ジェネティシン、ストレプトマイシン、カスガマイシン、スペクチノマイシンの計8種類のアミノグリコシド系抗生物質を用いてNMDA受容体に対する影響を*Xenopus*の卵母細胞を用いた電気生理学実験法により検討した(Fig. II-1)。

II-1. 材料と方法

(1) ネオマイシン、パロモマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ジェネティシン、ストレプトマイシン、カスガマイシン、スペクチノマイシンはSigmaから購入し、双極電位固定法にはCEZ-1250 Amplifier(日本光電)を使用した。capped cRNAの合成及び卵母細胞の調製はI-1の方法に従った(47、53、54)。卵母細胞に対して、NR1とNR2 cRNAの比が1:5になるように注入した(NR1 0.1~4 ng、NR2 0.5~20 ng)。測定にはBa²⁺-SOS(96 mM NaCl、2 mM KCl、1.8 mM BaCl₂、10 mM HEPES、pH 7.5)を使用し、多くの場合、測定時にK⁺-BAPTA(1個の卵母細胞につき40 mM K⁺-BAPTAを100 nM)を卵母細胞に注入した後、測定を行なった。

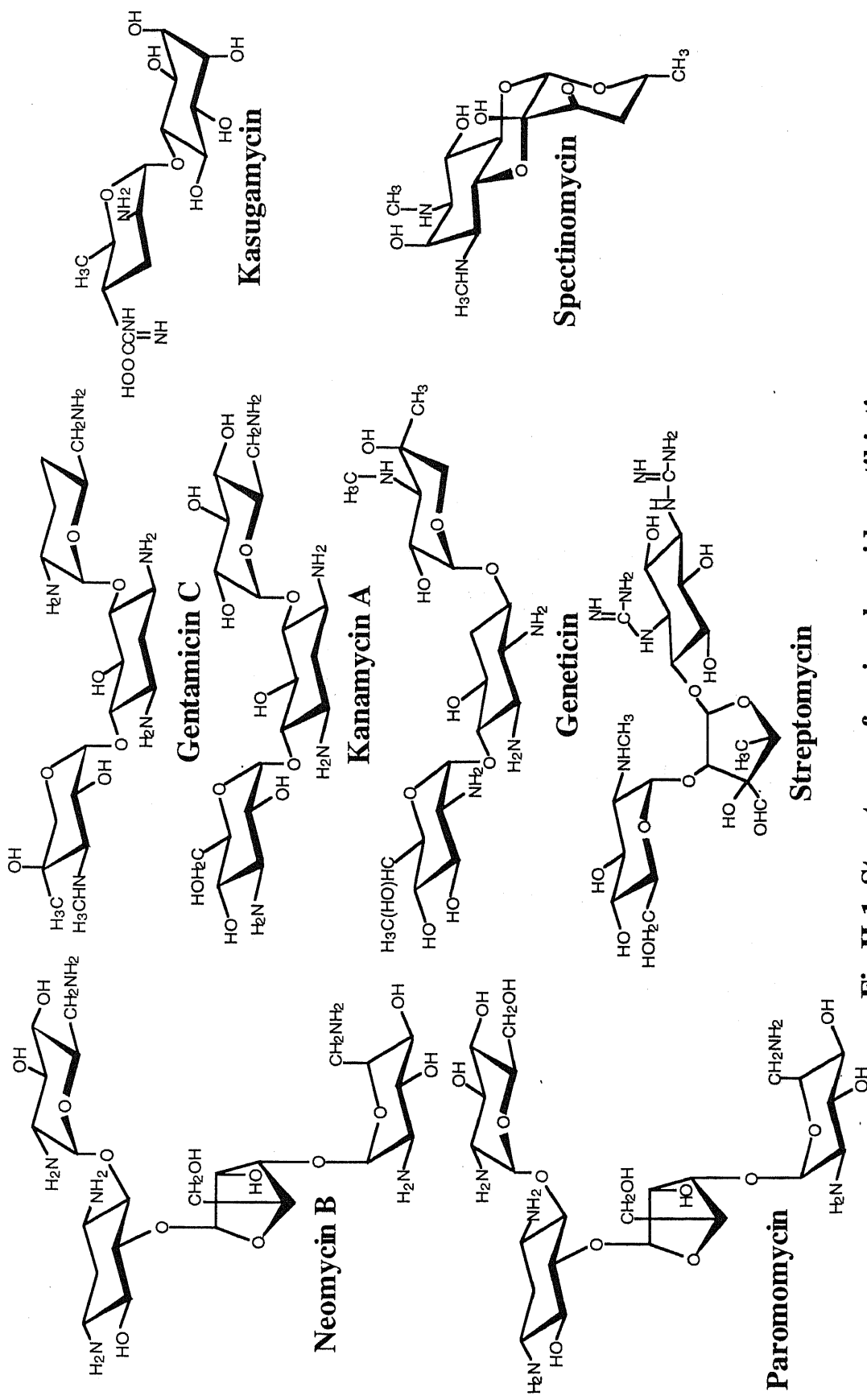


Fig.II-1. Structures of aminoglycoside antibiotics.

II-2. 結果

(1) アミノグリコシド系抗生物質の NMDA 受容体に及ぼす影響について調べるためまず、NR2 サブユニット特異性について -20 mV の固定電位で検討した (Fig. II-2)。その結果、ポリアミンと同様にネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシンにおいて NR2B サブユニット特異的な促進作用が認められた。そのため、NR2B サブユニットに対する各アミノグリコシド系抗生物質の濃度依存性について -20 mV の固定電位で検討した (Fig. II-3)。アミノ基の数が2個のカスガマイシンやスペクチノマイシンは NR1A/NR2B 受容体活性に影響を及ぼさなかったが、ポリアミンと同様にアミノ基の数が3個以上のアミノグリコシド系抗生物質はアミノ基の多い抗生物質ほど強く受容体活性を促進することが明らかとなった (Table II-1)。スペルミンは NMDA 受容体に対するグリシンの親和性を上げ、グルタミン酸の親和性を下げることが知られており、アミノグリコシド系抗生物質がスペルミンと同様に NR2B 特異的な促進効果を示したことから、グリシンとグルタミン酸の親和性に対する影響を調べた (Fig. II-4)。その結果、スペルミンと同様にアミノグリコシド系抗生物質は NMDA 受容体に対するグリシンの親和性を上げ、グルタミン酸の親和性を下げることが明らかとなった。また、スペルミンのグリシン非依存性促進効果は pH 依存性であるため (49)、アミノグリコシド系抗生物質の pH 依存性を検討した結果、アミノグリコシド系抗生物質は pH 7.75 や pH 8.50 に比べ pH 6.25 や pH 7.00 のほうが、強く NMDA 受容体活性を増強した。これらの結果より、アミノグリコシド系抗生物質の NMDA 受容体活性の促進効果は、ポリアミンのそれと類似した特性を示した。次にアミノグリコシド系抗生物質による聴覚障害がイフェンプロジルを投与することで緩和されることから、アミノグリコシド系抗生物質によって、増強された受容体活性に対するイフェンプロジルの影響について NR1A/NR2B 受容体を用い、 -20 mV の固定電位で検討した (Fig. II-6)。各アミノグリコシド系抗生物質により増強された受容体活性は、無添加とほぼ同程度までイフェンプロジルによって阻害された。これらの結果から、イフェンプロジルによる聴覚障害の緩和は NMDA 受容体活性を阻害することで生じると考えられた。次にポリアミンと同様にアミノグリコシド系抗生物質により NMDA 受容体活性の促進が認められたことから、アミノグリコシド系抗生物質がポリアミンと同様に電位依存性の阻害を示すか検討した (Fig. II-7)。NR1A/NR2A 受容体において、 -20 mV と -100 mV の固定電位で検討した結果、 -20 mV の固定電位ではアミノグリコシド系抗生物質による阻害は認められなかったが、 -100 mV では -20 mV に比べ阻害傾向が認められた。しかし、阻害の強さにはアミノグリコシド系抗生物質のアミノ基の数などによる一定の傾向は示さなかった。アミノグリコシド系抗生物質はスペルミンと同様に促進と阻害の両活性調節を示したことから、スペルミンの促進効果に関与するアミノ酸

残基や阻害に関与するアミノ酸残基の変異体を用いて、アミノグリコシド系抗生物質の影響を検討した (Fig. II-8, 9)。NR1A/NR2B 受容体の wild type 及びスペルミンの促進効果に関与する NR1A E181Q/E185Q、E342Q、W608L、N616Q、D669N 変異体を用いて -20 mV の固定電位で検討した結果、すべての変異体でアミノグリコシド系抗生物質の促進効果の消失が認められた (Fig. II-8)。この結果より、アミノグリコシド系抗生物質による NMDA 受容体活性の増強は、スペルミンの促進に関与するアミノ酸残基に作用して生じると考えられた。また、D669N 変異体において、200 μ M ネオマイシン存在下で受容体活性が50%以下に阻害された。この原因については明らかではないが、ネオマイシンは他のアミノグリコシド系抗生物質より比較的構造が大きく、アミノ基の数が多いため、D669 に作用できず、チャンネル孔内部の酸性アミノ酸残基と結合することで受容体活性を阻害したのではないかと考えた。次に、NR1A/NR2A 受容体の wild type 及びスペルミンの阻害効果に関与するアミノ酸残基の変異体である W563L、N616Q、E621Q、D669N を用い、アミノグリコシド系抗生物質による電位依存性の阻害について、-100 mV の固定電位で検討した (Fig. II-9)。N616Q、E621Q 変異体では、すべてのアミノグリコシド系抗生物質で阻害の減少傾向が認められるが、他の変異体ではアミノ基の数などによる一定の傾向は示さなかった。アミノグリコシド系抗生物質がスペルミンの促進に関与するアミノ酸残基と同じ部位に作用することから、スペルミンの促進効果に関与しないイフェンプロジル特異的な作用部位の変異体である Y109L、Y114L、D130N を用いて、アミノグリコシド系抗生物質による受容体活性の促進について検討した (Fig. II-10)。Y109L 変異体において、200 μ M ネオマイシンで3.5倍程度の促進効果が認められた。この変異体において若干の $pHIC_{50}$ の酸性側へのシフトが認められたが、Y109F変異体でも同様の結果が得られた (データ未掲載)。これらの結果から、チロシン残基のヒドロキシル基が NMDA 受容体活性を負に調節している可能性が考えられた。また、すべての変異体において、アミノグリコシド系抗生物質による受容体活性の促進の減少が認められなかったことから、アミノグリコシド系抗生物質はイフェンプロジル特異的な作用部位に作用せず、スペルミンの促進効果に関与するアミノ酸残基に作用して、NR1A/NR2B 受容体の受容体活性を促進することが示唆された。

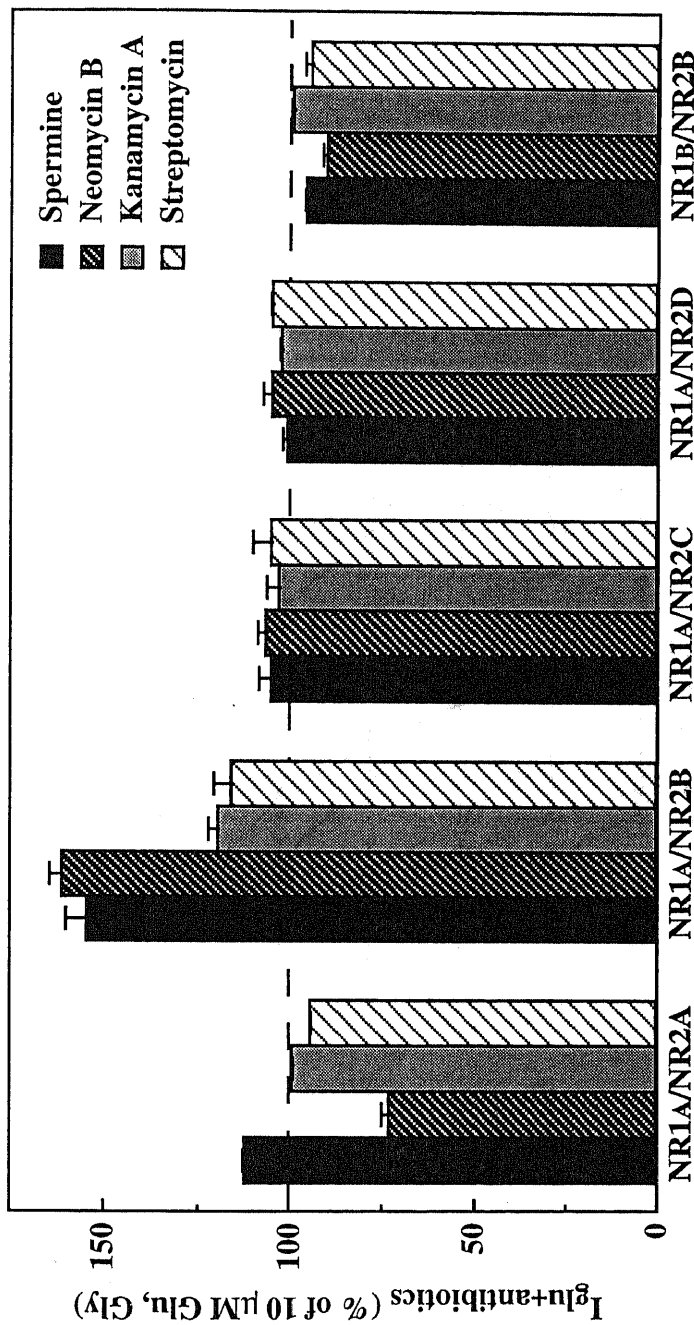


Fig.II-2. NMDA receptor subunit specificity of aminoglycoside effect.

The effects of 100 μ M spermine and 200 μ M aminoglycoside antibiotics were determined at NR1A/NR2A, NR1A/NR2B and NR1B/NR2B receptors at -20 mV and NR1A/NR2C and NR1A/NR2D receptors at -30 mV. Values are mean \pm S.E.M. from four oocytes.

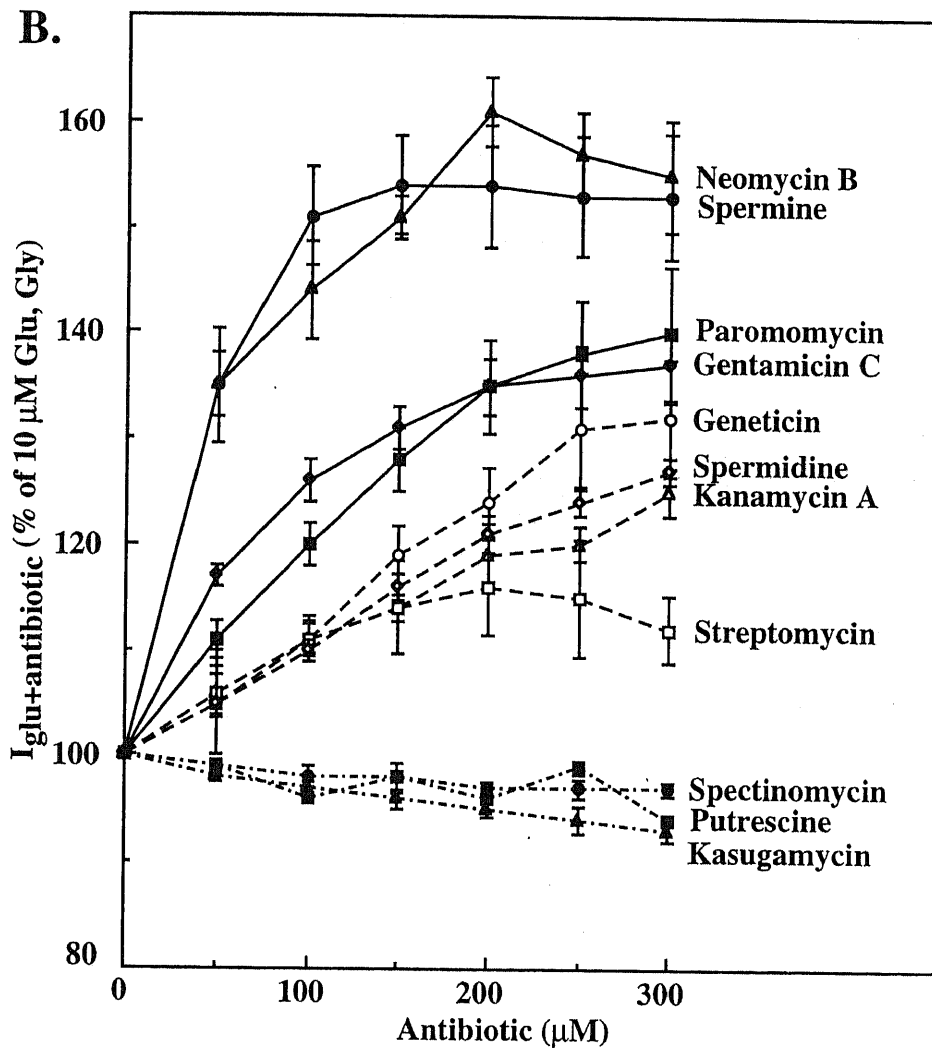
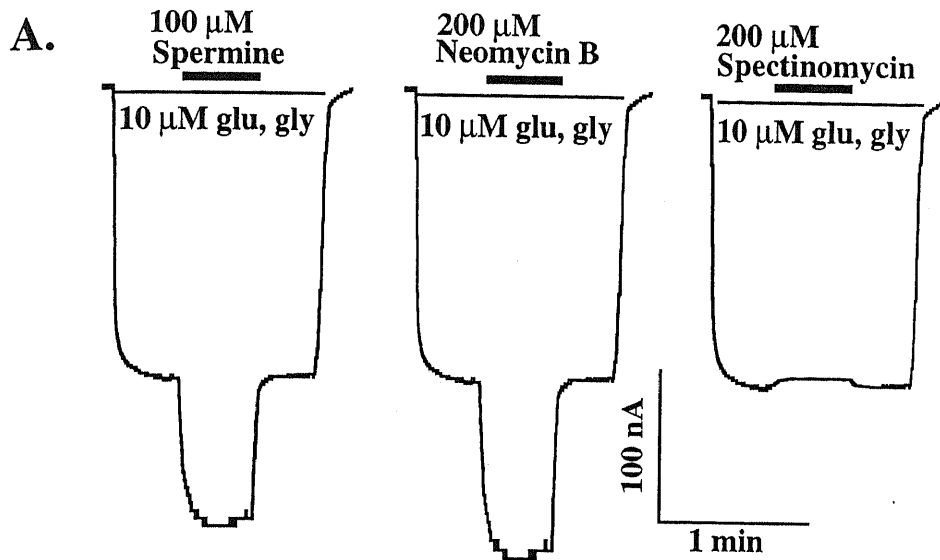


Fig. II-3. Effects of various concentration of aminoglycoside.
 A. The effects of 100 μ M spermine and 200 μ M neomycin B or spectinomycin on inward currents induced by glutamate (glu, 10 μ M; with 10 μ M glycine) were measured in oocytes expressing NR1A/NR2B receptors and voltage-clamped at -20 mV. B. The effects of various concentrations of aminoglycosides were shown.

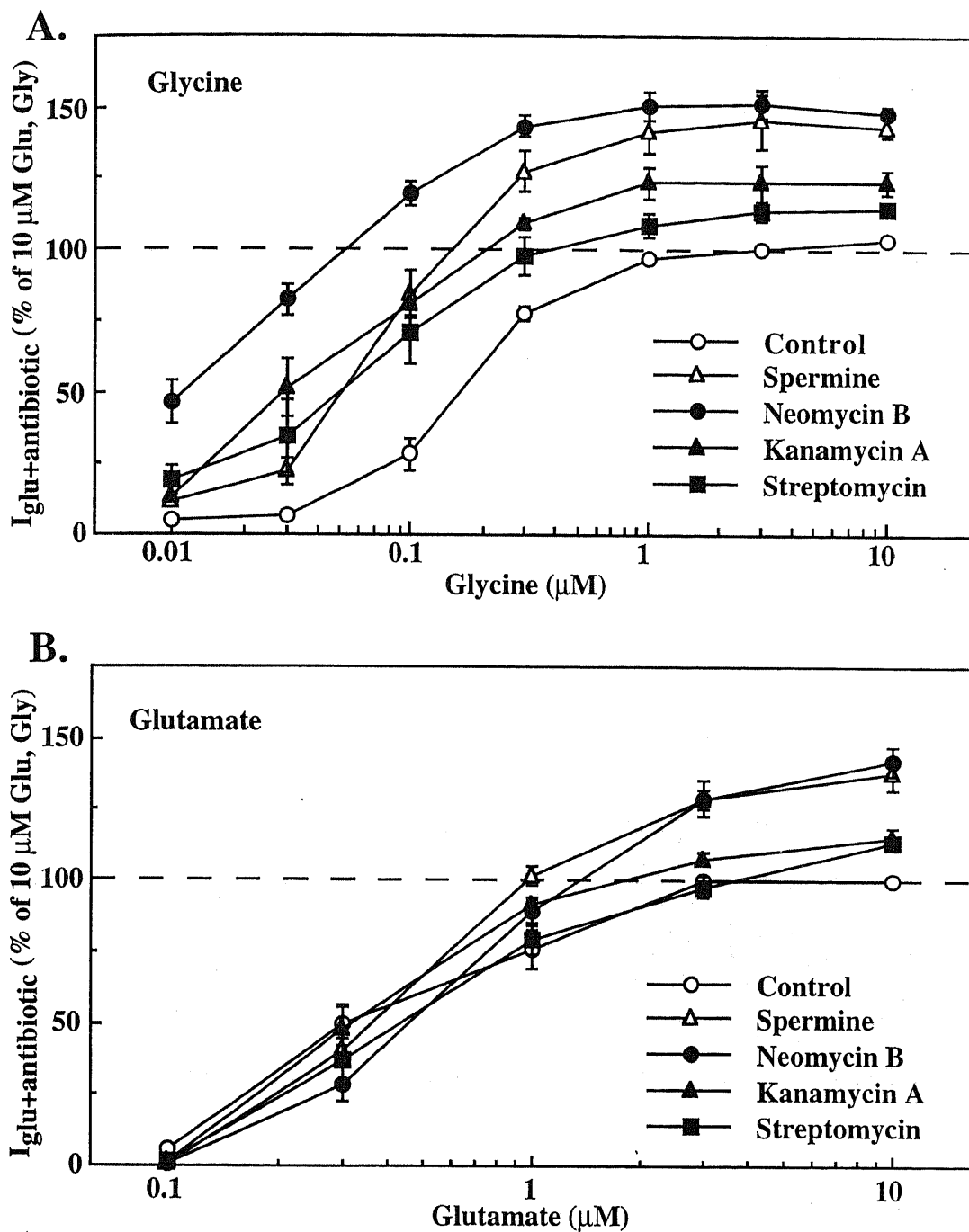
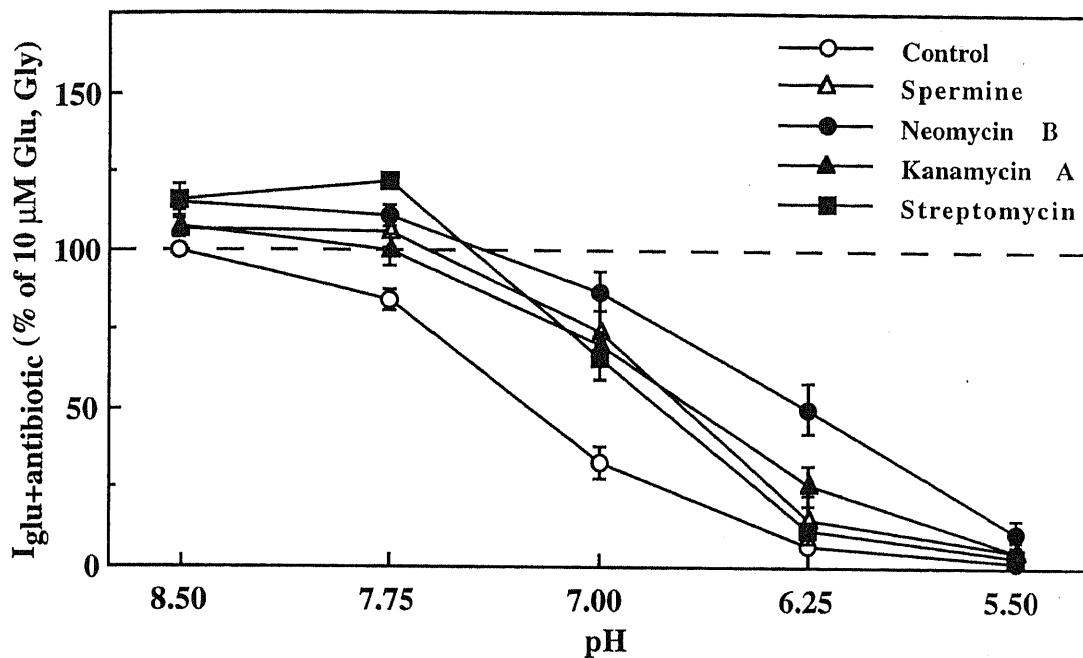


Fig.II-4. Effects of glycine and glutamate on enhancement of NMDA receptor activity by aminoglycoside antibiotics.

The effects of 100 μ M spermine and 200 μ M aminoglycoside antibiotics were determined in oocytes expressing NR1A/NR2B receptors and voltage-clamped at -20 mV by changing glycine (A) and glutamate (B). Values are mean \pm S.E.M. from four oocytes.

A.



B.

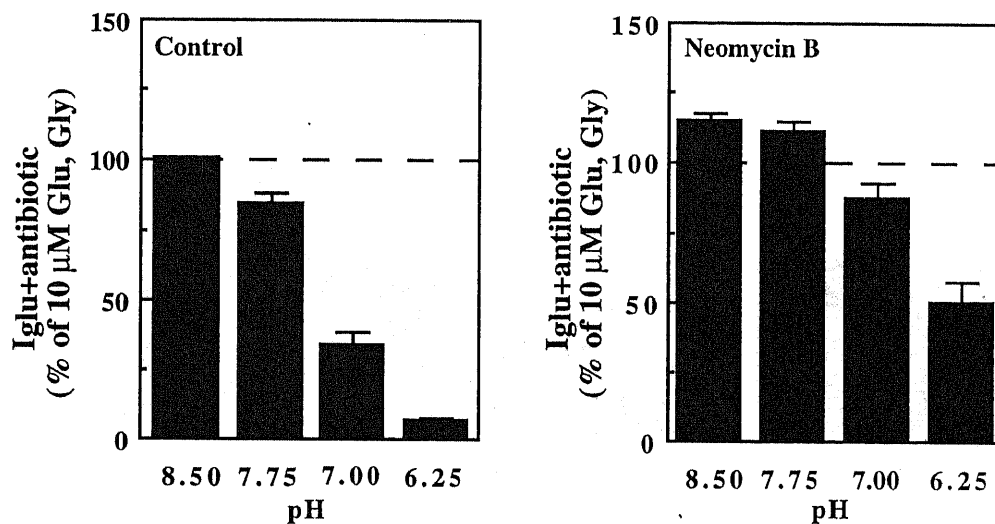


Fig.II-5. Effects of pH on enhancement of NMDA receptor activity by aminoglycoside antibiotics.

A. Effects of various extracellular pH in the presence of 100 μ M spermine and 200 μ M aminoglycoside antibiotics on NR1A/NR2B receptors. B. Inward currents at pH 6.25, 7.00, 7.25 and 8.50 in the presence of 100 μ M spermine and 200 μ M Neomycin B were measured in oocytes expressing NR1A/NR2B receptors and voltage-clamped at -20 mV. Responses to glutamate at a given pH are expressed as a fraction of the response to glutamate at pH 8.50. Values are mean \pm S.E.M. from four oocytes.

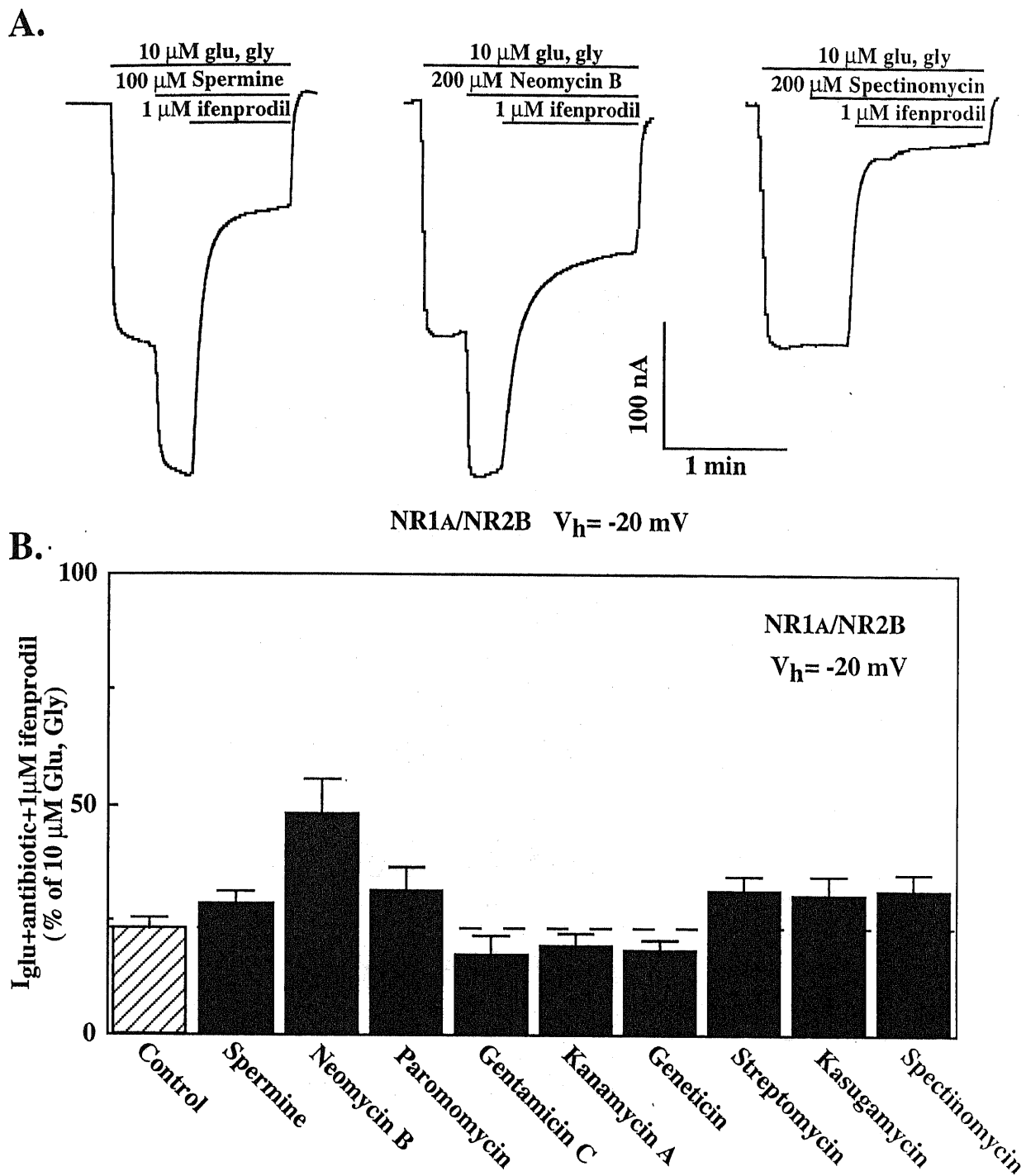


Fig.II-6. Effects of ifenprodil on NMDA receptor activity in the presence of 200 μ M aminoglycoside antibiotics.

The effects of 1 μ M ifenprodil on responses to 10 μ M glutamate 10 μ M glycine and 200 μ M aminoglycoside antibiotics were determined in oocytes expressing NR1A/NR2B receptors and voltage-clamped at -20 mV. A. Inward currents with 100 μ M spermine, 200 μ M neomycin B and 200 μ M spectinomycin were shown. B. Data were shown as % of remaining activity in the presence of 1 μ M ifenprodil. Values are mean \pm S.E.M. from four oocytes.

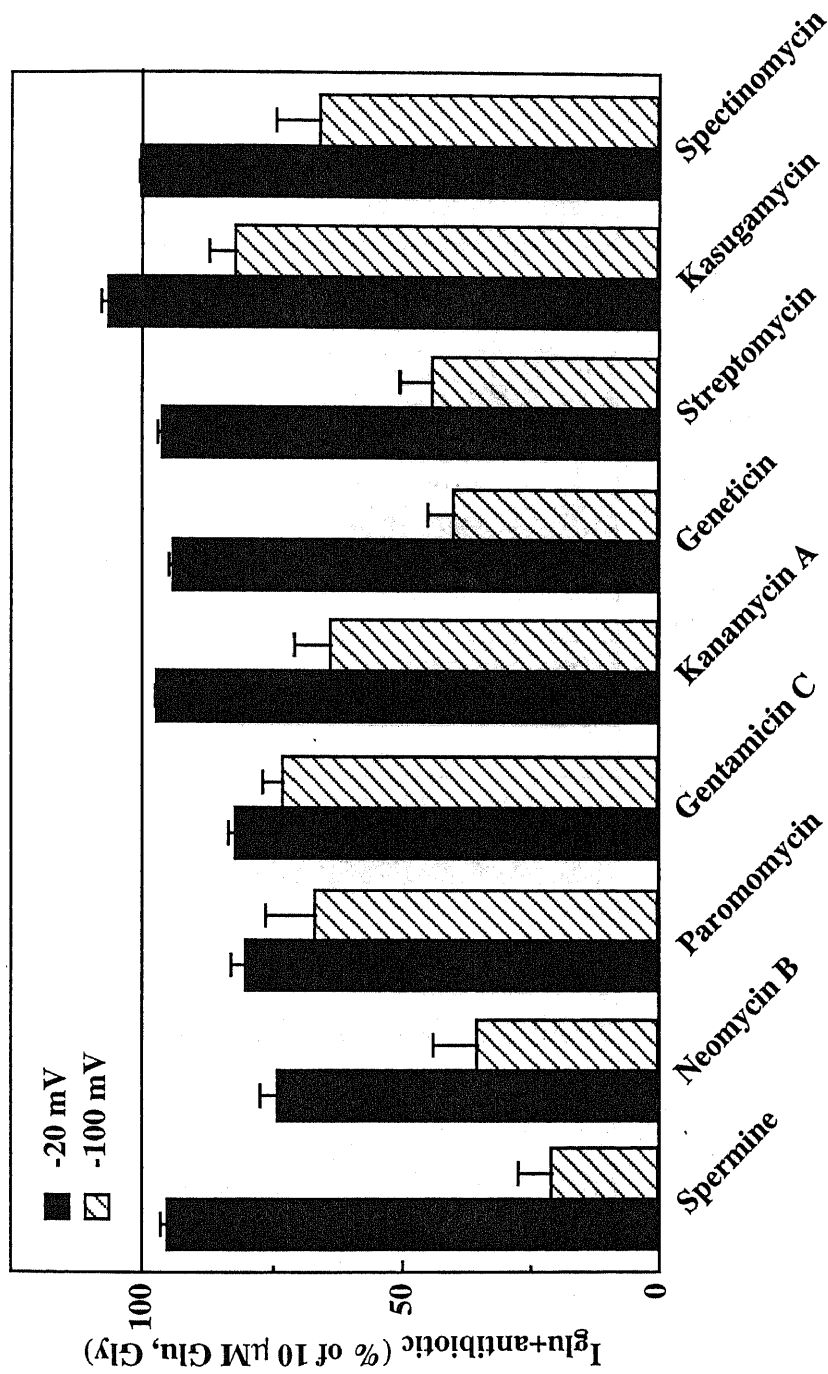


Fig.II-7. Effects of aminoglycoside antibiotics on glycine-independent stimulation and voltage-dependent inhibition on NR1A/NR2A.

The effects of 200 μ M aminoglycoside antibiotics were determined in oocytes expressing NR1A/NR2A and voltage-clamped at -20 mV and -100 mV. Values are mean \pm S.E.M. from four oocytes.

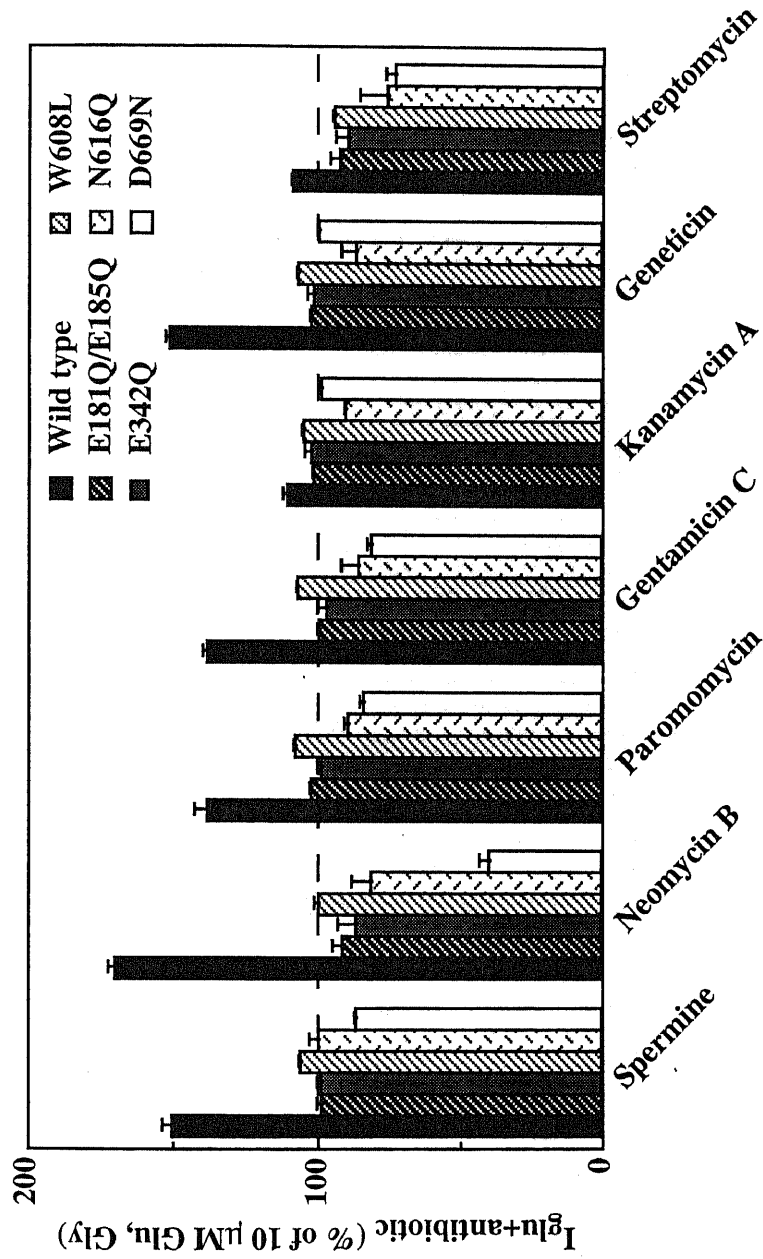


Fig.II-8. Effects of aminoglycoside antibiotics at mutated NMDA receptor in a spermine binding site for stimulation.

The effects of 200 μ M aminoglycoside antibiotics were determined at mutated NR1A/NR2B receptors at -20 mV. Values are mean \pm S.E.M. from four oocytes.

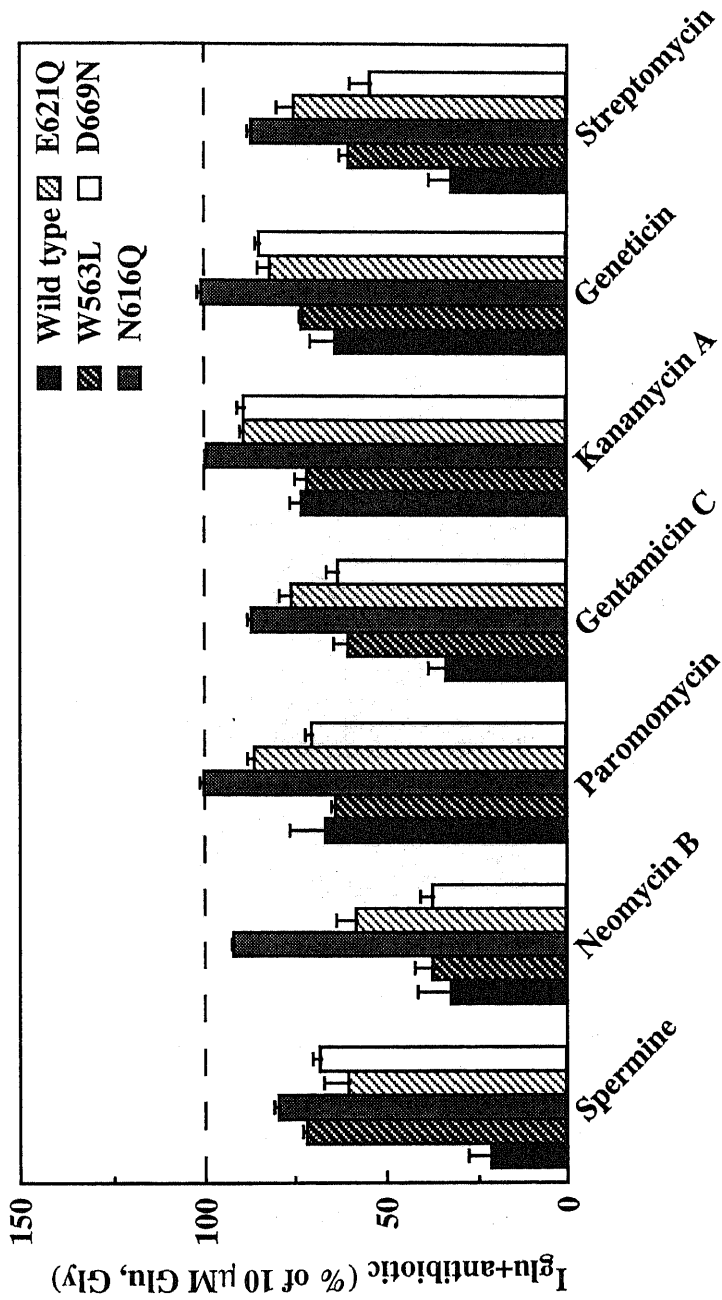


Fig.II-9. Effects of aminoglycoside antibiotics at mutated NMDA receptor in a spermine binding site for voltage-dependent inhibition.

The effects of 200 μ M aminoglycoside antibiotics were determined at mutated NR1A/NR2A receptors at -100 mV. Values are mean \pm S.E.M. from four oocytes.

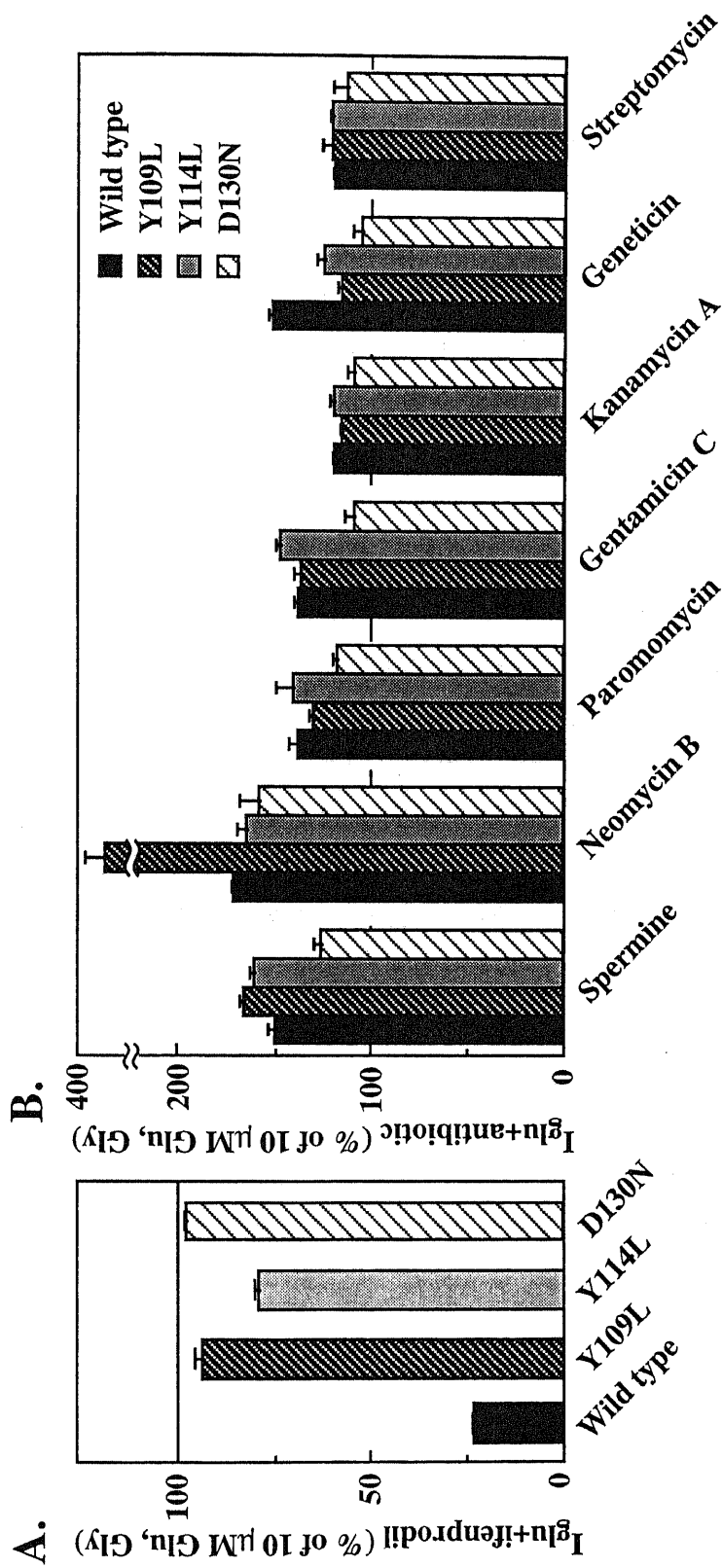


Fig.II-10. Effects of aminoglycoside antibiotics at mutated NMDA receptor in an ifenprodil specific binding site.

A. Effects of 1 μM ifenprodil were determined at mutated NR1A/NR2B receptors and voltage-clamped at -20 mV. B. The effects of aminoglycoside antibiotics were determined at mutated NR1A/NR2B receptors at -20 mV. Values are mean ± S.E.M. from four oocytes.

II-3. 結論

アミノグリコシド系抗生物質はアミノ酸とアミノサイクリトールがグリコシド結合した構造を有する一群の抗生物質で強い抗菌作用を示すが、一方で聴覚障害などの副作用を示すことから、その使用が限られている(63、64)。また、アミノグリコシド系抗生物質の副作用である聴覚障害はNMDA受容体のポリアミン結合部位に作用し、受容体活性を促進することで生じると考えられている(65)。そのため、NMDA受容体のポリアミンによる活性調節に関与するアミノ酸残基の変異体を用いて検討した。その結果、アミノグリコシド系抗生物質は、ポリアミンと同様にNR2Bサブユニット特異的にNMDA受容体活性を促進し、アミノグループ(アミノ基、イミノ基、グアニジン基)の数が多きほど強く受容体活性を促進することが明らかとなった。また、アミノグリコシド系抗生物質による受容体活性の促進効果はポリアミンと同様にpH感受性、NMDA受容体に対するグリシンの親和性の増加やグルタミン酸の親和性の低下などの特徴が認められた。さらに、アミノグリコシド系抗生物質はイフェンプロジル特異的な作用部位ではなく、ポリアミンの促進に関与するアミノ酸残基であるNR1A E181/E185、E342、N616、D669に作用してNMDA受容体活性を促進し、その促進の強さと聴覚障害の起こりやすさに一定の相関が認められた(Table II-1)。そのため、アミノグリコシド系抗生物質はNR1A/NR2B受容体のポリアミン結合部位に作用して、過剰に受容体活性を促進することで聴覚障害を引き起こすことが示唆された。これらの結果より聴覚障害を起こさないアミノグリコシド系抗生物質を探索することは非常に困難だと考えられる。なぜなら、すべてのアミノグリコシド系抗生物質はNMDA受容体との結合部位に重要だと考えられるいくつかのアミノ基、イミノ基、グアニジン基などを持っているため、細胞外からNMDA受容体活性を促進すると考えられるからである。しかしながら、アミノグリコシド系抗生物質は強い抗菌作用を示す有用な抗生物質であるため、イフェンプロジルやその誘導体などのようなアミノグリコシド系抗生物質がNMDA受容体に結合することを防ぐ化合物と併用することで蝸牛の内有毛細胞や外有毛細胞を保護することが、聴覚障害を防ぐ有効な手段であると考えられる。

Table II-1. Relationship between enhancement of NMDA receptor activity and hearing loss.

| Compound | Amino group | Enhancement of NMDA receptor activity | Hearing loss |
|---------------|-------------|---------------------------------------|--------------|
| Spermine | 4 | ++++ | n. d. |
| Spermidine | 3 | +++ | n. d. |
| Putrescine | 2 | — | n. d. |
| Neomycin B | 6 | ++++ | ++++ |
| Paromomycin | 5 | ++++ | ++++ |
| Gentamicin C | 5 | +++ | ++++ |
| Kanamycin A | 4 | +++ | +++ |
| Geneticin | 4 | +++ | n. d. |
| Streptomycin | 3 | ++ | ++ |
| Kasugamycin | 2 | — | n. d. |
| Spectinomycin | 2 | — | — |

第Ⅲ章 神経系におけるポリアミン輸送

神経伝達物質は神経終末のシナプス小胞体に蓄えられており、現在までに、グルタミン酸、アセチルコリン、 γ -アミノ酪酸、グリシン、ATP、ドーパミンなどのモノアミン類の輸送系が同定されている(69-71)。シナプス小胞体にこれらの輸送系を介して貯められた神経伝達物質は、神経終末にインパルスが到達するとエキソサイトシスでシナプス間隙に放出される。神経伝達物質として最初に同定されたアセチルコリンはその受容体に作用した後、近傍にあるコリンエステラーゼにより速やかに分解され、その神経伝達が終結することが明らかとなった(72)。しかし、その後多くの研究から酵素的分解による神経伝達の終結はむしろアセチルコリンのみが例外で、他のすべての神経伝達物質について、その神経伝達終結は神経細胞の終末部分やグリア細胞への再取り込みによるものであることが明らかとなった(73)。

Xenopus の卵母細胞を用いた電気生理学的な実験で、ポリアミンが細胞外から NMDA 受容体を促進することが知られていること(30)や我々が現在までに明らかにしているポリアミンの促進に関与しているアミノ酸残基が細胞外領域に存在することから、生体内においてもポリアミンが細胞外から NMDA 受容体に対して作用するのではないかと考えた。しかし、ラットなどの脳においてシナプス間隙を満たしている脳脊髄液には、nM オーダーでしかポリアミンが存在していない(74、75)。そのため、生体内においてポリアミンがどのような機構でシナプス間隙に放出され、NMDA 受容体活性を調節した後、どのような不活性化機構が存在するか明らかにするために検討を行なった。

Ⅲ-1. 材料と方法

(1) シナプス小胞体の調製

シナプス小胞体の調製法は主に Kish らの方法に従った(76)。6週令ラットの大脳(1匹1.2~1.4g)を10倍量の140 mM グルクロン酸溶液(140 mM グルクロン酸カリウム、1 mM 炭酸水素ナトリウム、1 mM 酢酸マグネシウム、pH 7.2)でホモジナイズし、12,000×g、15分間遠心分離した。得られた沈澱を20倍量の6 mM トリス・マレイン酸溶液(pH 8.1)で浸透圧ショックをかけ、43,500×g、15分間超遠心分離を行ない、さらに得られた上清を200,000×g、60分間超遠心分離した。その沈澱をシナプス小胞体画分として得た。得られたシナプス小胞体にさらに10 mM グルコン酸カリウム溶液でさらに浸透圧ショックをかけ、神経伝達物質などの内容物の抜けたゴーストのシナプス小胞体を調製し、その後の取り込み活性の測定に使用した(77)。

(2) シナプトソームの調製

シナプトソームの調製法は Fletcher らの方法に従った (78, 79)。6週令のラットの脳 (1匹1.2~1.4g) を9倍量の0.32 M シュークローズでホモジナイズして、1,200×g、10分間遠心分離した。その上清を等倍量の1.2 M シュークローズ溶液に重層し、110,000×g、20分間超遠心分離した。得られた中間層をさらに0.8 M シュークローズ、10 mlに重層し、110,000×g、20分間超遠心分離し、得られた沈澱をシナプトソーム画分として、その後の取り込み活性の測定に使用した。

(3) アストログリア培養細胞の調製

アストログリア培養細胞の調製法は主に Asou らの方法に従った (80, 81)。生後約3日のラットから脳皮質を取り出し、30分間、トリプシン処理を行なった。その後、10% FBS-MEM 培地 (100 U ペニシリン、ストレプトマイシンと2 mM グルタミンを含む) で培養した。

(4) ポリアミン測定と蛋白定量

ポリアミン定量は Igarashi らの方法 (82)、蛋白定量は Lowry らの方法 (83) で行った。

(5) シナプス小胞体、シナプトソーム、アストログリア細胞へのポリアミン輸送

シナプス小胞体での測定は主に Kish らの方法に従った。シナプス小胞体 (200 μg) 画分を30℃、1分間プレインキュベーションした後、基質である200 μM [¹⁴C]スベルミン、スベルミジンまたは50 μM [¹⁴C]グルタミン酸を添加し、数分間インキュベーションした。反応液を HAWP フィルター (ミリポア) に移し、140 mM 塩化カリウム+1 mM ポリアミン溶液を用いて反応停止を行なった (5 ml×3回)。フィルターをバイアルビンに移し、3 ml Bray 溶液を加えて、液体シンチレーションカウンターで取り込まれた [¹⁴C] ポリアミン量を測定した。

シナプトソームでの測定は Fletcher らの方法に従った。シナプトソーム (100 μg) 画分を30℃、1分間プレインキュベーションした後、基質である100 μM [¹⁴C]スベルミンまたはスベルミジンを添加し、数分間インキュベーションした。反応液を GF/B フィルター (Watman) に移し、118 mM 塩化ナトリウム+1 mM ポリアミン溶液を用いて反応停止を行なった (5 ml×3回)。フィルターをバイアルビンに移し、3 ml Bray 溶液を加えて、液体シンチレーションカウンターで取り込まれた [¹⁴C] ポリアミン量を測定した。

アストログリア細胞での測定は Kakinuma らの方法で行なった (84)。アスト

ログリア細胞を 5×10^6 cells/ml程度に10 % FBS-MEM 培地で調製し、 $100 \mu\text{M}$ [^{14}C] スペルミンまたはスペルミジンを添加し、 30°C でインキュベーションを行なった。反応開始から0.5、4、8、12分後に反応液から $500 \mu\text{l}$ を採取し、 $600 \mu\text{l}$ のオイル（コーンオイル：フタル酸ジ-n-ブチル=3：10）の上に重層し、遠心により細胞を沈澱させ、上清を除去した後の沈澱を1 mlの5 % トリクロロ酢酸でよく懸濁し、超音波で細胞を破碎した。この懸濁にトルエン-トライトン系シンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで取り込まれた [^{14}C] ポリアミン量を測定した。

III-2. 結果

(1) シナプス小胞体へのポリアミン輸送

ラットの大脳からシナプス小胞体画分を分画し、その際のそれぞれの画分のポリアミン定量を行なった。whole cellsのスペルミジン、スペルミン含量はそれぞれ 4.25 ± 0.15 nmol/mg protein、 3.10 ± 0.40 nmol/mg proteinで、P200のシナプス小胞体画分では 4.66 ± 0.68 nmol/mg protein、 8.26 ± 1.02 nmol/mg proteinであった (Table III-1)。スペルミジン含量はwhole cellsとシナプス小胞体画分であまりかわらなかったが、スペルミン含量はwhole cellsに比べシナプス小胞体画分で2.7倍程度の濃度の増加が認められた。この結果より、シナプス小胞体に対してスペルミンが特異的に蓄積されていると考えられる。そのため、シナプス小胞体に対するポリアミンの取り込み活性について検討した。その際に使用したシナプス小胞体はさらに浸透圧ショックをかけ、ゴーストにしたシナプス小胞体画分を使用した。ゴーストにしたシナプス小胞体に対するスペルミジン、スペルミン、グルタミン酸の取り込み活性は、それぞれ 73 pmol/mg protein/min、 180 pmol/mg protein/min、 161 pmol/mg protein/minであった。神経伝達物質であるグルタミン酸と同様にスペルミンにおいてシナプス小胞体への取り込み活性が認められ、スペルミジンにおいても弱いながら取り込み活性が検出された (Fig. III-1)。また、これらの取り込み活性はATP依存性が認められた。シナプス小胞体に対するスペルミジン、スペルミンの取り込みの K_m 値はそれぞれ $483 \mu\text{M}$ 、 $61.5 \mu\text{M}$ であり、 V_{max} は 568 pmol/mg protein/min、 72 pmol/mg protein/minであった (Fig. III-2)。

(2) アストログリア培養細胞へのポリアミン輸送

シナプス小胞体において、スペルミジン、スペルミンの取り込み活性が認められたことからシナプス間隙にポリアミンが放出されると考えられるが、脳脊髄液にはポリアミンはほとんど存在していないことから不活性化機構が存在すると考えた。神経伝達物質であるグルタミン酸は神経細胞の神経終末側やグリア細胞に取り込まれること

Table III-1. Polyamine contents of each fraction in rat brain.

| Fraction | Polyamine content (nmol / mg protein) | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|
| | FUT | SPD | SPM |
| whole cells | 0.06 ± 0.001 | 4.25 ± 0.15 | 3.10 ± 0.40 |
| S45 | 0.03 ± 0.005 | 1.88 ± 0.27 | 2.28 ± 0.07 |
| P45 | 0.03 ± 0.009 | 5.60 ± 2.00 | 3.44 ± 1.15 |
| S200 | 0.03 ± 0.005 | 1.15 ± 0.16 | 0.77 ± 0.08 |
| P200 (Synaptic vesicles) | 0.02 ± 0.005 | 4.66 ± 0.68 | 8.28 ± 1.02 |

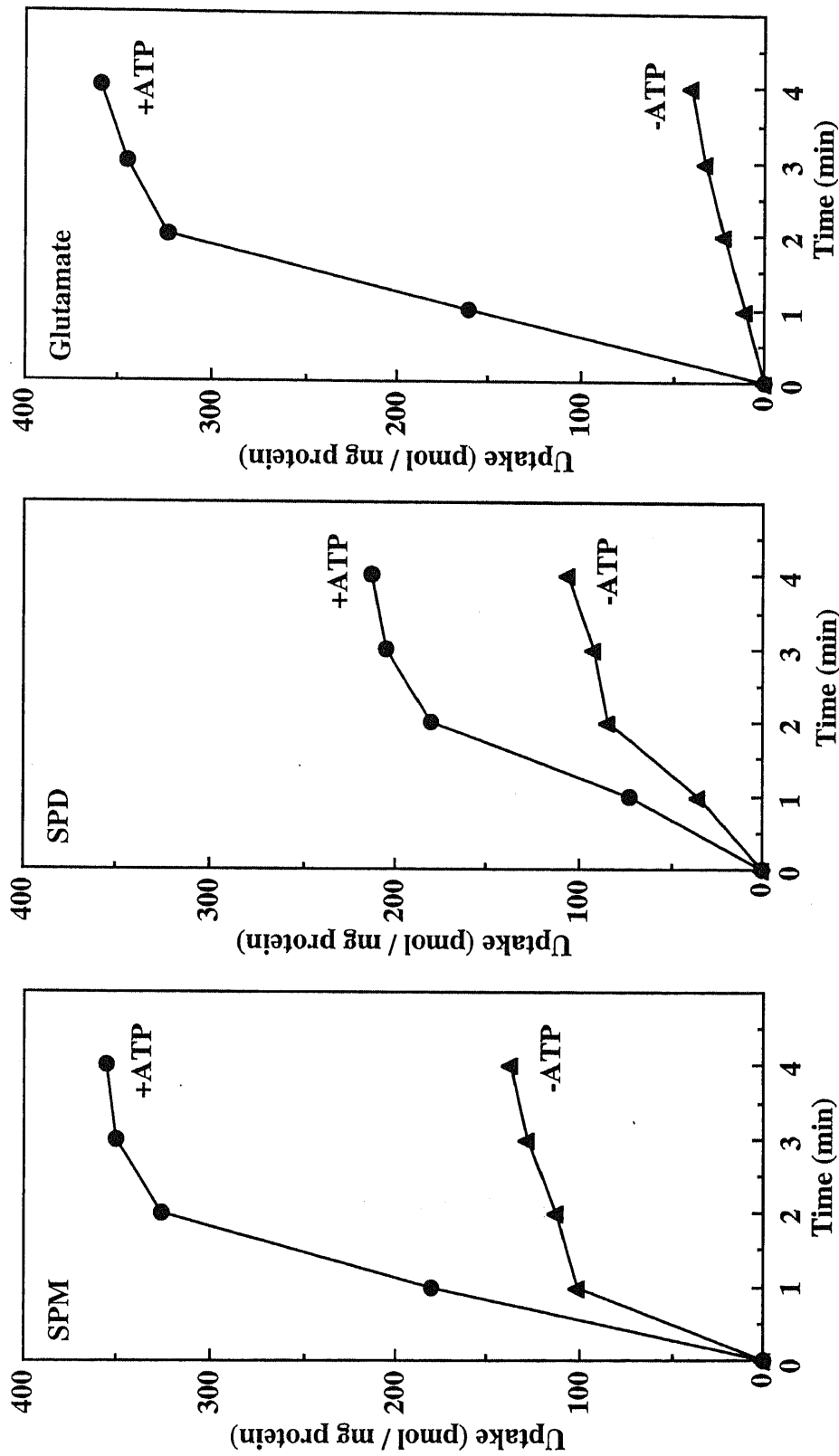
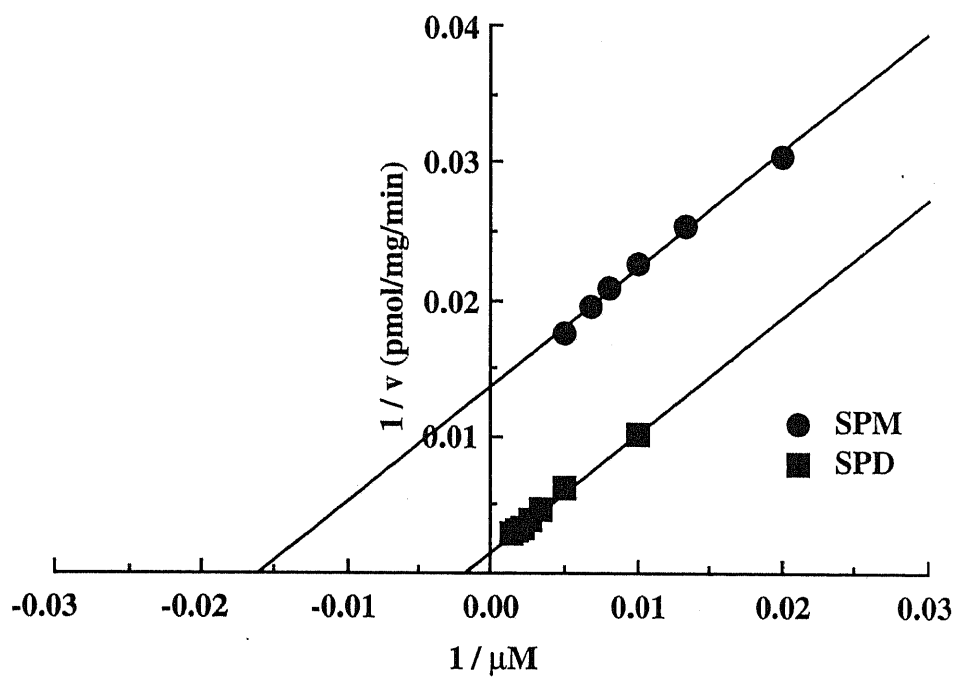


Fig.III-1. Uptake of SPM, SPD and glutamate by synaptic vesicles.

The preparations were incubated for various periods of time as indicated, using the standard assay conditions described in materials and methods. Synaptic vesicle ghosts were assayed for spermine, spermidine and glutamate uptake at 30 °C in the presence or absence of 2 mM ATP.



| | K_m (μM) | V_{max} (pmol/mg/min) |
|-----|-------------------------|--------------------------------|
| SPM | 61.5 | 72 |
| SPD | 483 | 568 |

Fig.III-2. Kinetic analysis of polyamine uptake by synaptic vesicles.

The reaction mixture containing various concentrations of spermine and spermidine was incubated for 2 min. The data were shown as the Lineweaver-Burk plot.

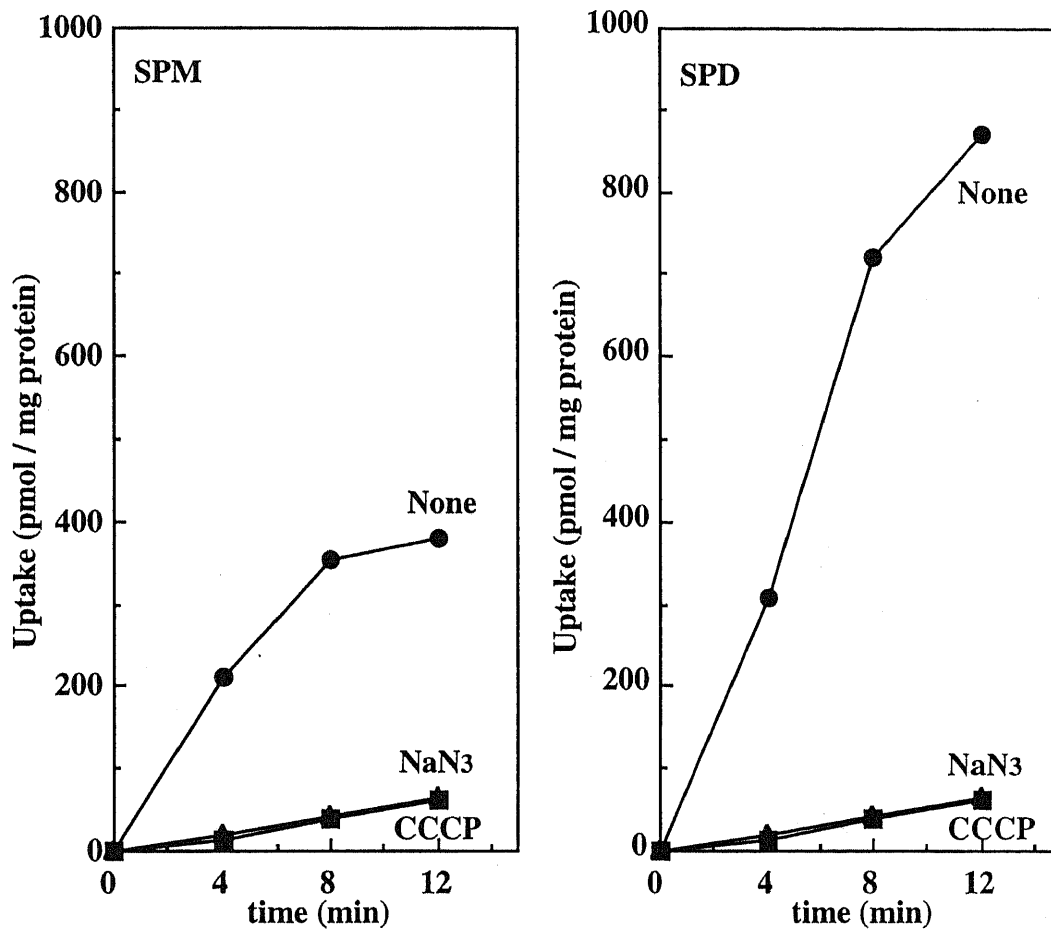


Fig.III-3. Uptake of SPM, SPD by glial cells.

The preparations were incubated for various periods of time as indicated, using the standard assay conditions described in materials and methods. The glial cells were assayed for spermine and spermidine uptake at 30 °C in the presence or absence of CCCP or NaN₃.

で不活性化される機構が存在する(85-88)。そのため、ポリアミンに関しても同様の不活性化機構が存在すると考え、シナプトソーム画分を調製してポリアミンの取り込み活性を測定したが、検出できなかった(データ未掲載)。次にラットの大脳からアストログリア細胞を調製し、スペルミジン、スペルミンの取り込み活性を検討した結果、それぞれ77.5 pmol/mg protein/min、52.8 pmol/mg protein/minの取り込み活性が認められた(Fig. III-3)。これらの取り込み活性に対するNaN₃(アジ化ナトリウム)やCCCP(カルボニルシアニド m-クロロフェニルヒドラゾン)の影響を検討した結果、取り込み活性が完全に抑えられたことから、これらの取り込み活性がエネルギー依存性であることが示唆された。

III-3. 結論

Xenopus の卵母細胞を用いた電気生理学的な実験で、ポリアミンが細胞外からNMDA受容体を促進すること(30)や我々が現在までに明らかにしているポリアミンの促進に関与しているアミノ酸残基が細胞外領域に存在することから、生体内においてもポリアミンが細胞外からNMDA受容体に対して作用すると考えた。しかし、シナプス間隙を満たしている脳脊髄液にポリアミンはnMオーダーでしか存在しない(74、75)ため、ポリアミンのシナプス間隙への放出機構が実際に存在するか検討を行った。ラットの大脳からシナプス小胞体画分を調製し、ポリアミン定量を行った結果、スペルミンのシナプス小胞体への蓄積が認められた。さらに、このスペルミンの蓄積は、他の神経伝達物質同様にATP依存的な輸送系によるものであることが示唆された。次に不活性化機構について明らかにするため、ポリアミンのラット大脳のアストログリア細胞やシナプトソーム画分への取り込み活性を検討した。シナプトソーム画分へのポリアミンの取り込み活性は検出できなかったが、アストログリア細胞では、エネルギー依存的な取り込み活性が認められた。これらの結果からシナプスにおいて、スペルミンは興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸と同様にシナプス小胞体に蓄積され、神経終末にインパルスが到達するとエキソサイトーシスでシナプス間隙に放出される。放出されたスペルミンはNMDA受容体活性を促進した後、主にアストログリア細胞に取り込まれるという不活性化機構が存在することが示唆された。また、NMDA受容体に対するグルタミン酸のEC₅₀が2~3 μMであるのに対し、スペルミンのEC₅₀がおよそ50 μMであることやアストログリア培養細胞へのスペルミンの取り込み活性が、神経伝達物質であるグルタミン酸に比べ100倍程度低かったことから、スペルミンは脳において、長期記憶を形成する際に認められるような、非常に強く継続的なインパルスが神経終末に入力にされた時にシナプス間隙に放出されて、NMDA受容体活性を促進し、記憶の形成などに関与している可能性が考えられた。

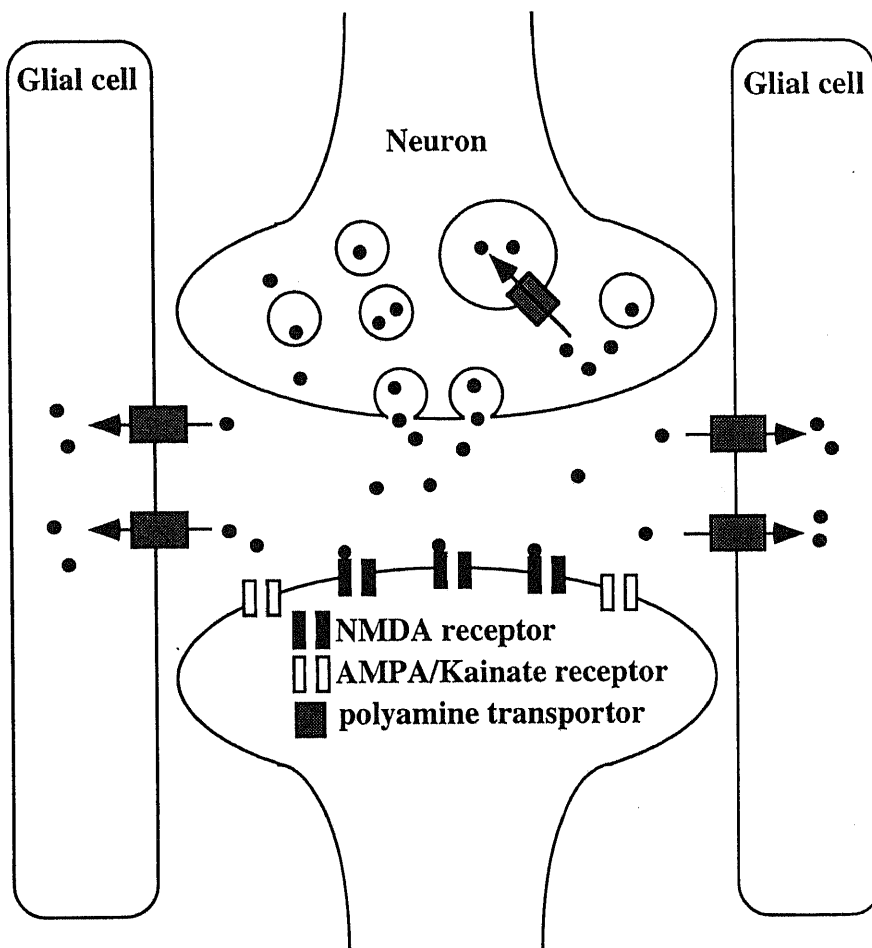


Fig.III-4. Model of polyamine transport in nervous system.

参考文献

1. Tabor, C. W. and Tabor, H. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 285-306.
2. Russell, D. H., Levy, C. C., Schimpff, S. C. and Hawk, I. A. (1971) *Cancer Res.* **31**, 1555-1558.
3. Tabor, C. W., and Tabor, H. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 749-790.
4. Pegg, A. E. (1986) *Biochem. J.* **234**, 249-262.
5. Tabor, H., Hafner, E. W. and Tabor, C. W. (1980) *J. Bacteriol.* **144**, 952-956.
6. Cohn, M. S., Tabor, C. W. and Tabor, H. (1980) *J. Bacteriol.* **142**, 791-799.
7. Steglich, C. and Scheffler, I. E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 4603-4609.
8. Pohjanpelto, P., Virtanen, I. and Holtta, E. (1981) *Nature (London)* **293**, 475-477.
9. Pohjanpelto, P., Holtta, E. and Janne, O. A. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1385-1390
10. Seppanen, P., Alhonen-Hongisto, L. and Janne, J. (1981) *Eur. J. Biochem.* **118**, 571-576.
11. Rudkin, B. B., Mamont, P. S. and Seiler, N. (1984) *Biochem. J.* **217**, 731-741.
12. Marton, L., Edwards, M., Levin, V., Lubich, W. and Wilson, C. (1979) *Cancer Research* **39**, 993-997.
13. Ficker, E., Tagliatela, M., Wible, B. A., Henly, C. M. and Brown, A. M. (1994) *Science* **266**, 1068-1072.
14. Isa, T., Lino, M., Itazawa, S. and Ozawa, S. (1995) *NeuroReport* **6**, 2045-2048.
15. Koh, D. S., Burnashev, N. and Jonas, P. (1995) *J. Physiol.* **486**, 305-312.
16. Ransom, R. W. and Stec, N. L. (1988) *J. Neurochem.* **51**, 830-836.
17. Sugihara, H., Moriyoshi, K., Ishii, T., Masu, M. and Nakanishi, S. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **185**, 826-832.
18. Hollmann, M., Boulter, J., Maron, C., Beasley, L., Sullivan, J., Pecht, G. and Heinemann, S. (1993) *Neuron* **10**, 943-954.
19. Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. (1992) *Science* **256**, 1217-1221.
20. Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M., Sakimura, K. and Mishima, M. (1992) *Nature* **357**, 70-74.
21. Kutuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. and Mishina, M. (1992) *Nature* **358**, 36-41

22. Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M. and Nakanishi, S (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 2836-2843
23. Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H. and Kuhse, J. (1994) *Neuron* **12**, 343-352.
24. Hirai, H., Kirsch, J., Laube, B., Betz, H. and Kuhse, J. (1996) *Proc. Acad. Sci. USA* **93**, 6031-6036.
25. Wafford, K. A., Kathoria, M., Bain, C. J., Marshall, G., Le Bourdelles, B., Kemp, J. A. and Whiting, P.J. (1995) *Mol. Pharmacol.* **47**, 374-380.
26. Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, S. H. and Kuhse, J. (1997) *Neuron* **18**, 493-503.
27. Hollman, M. and Heinemann, S. (1994) *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 31-108.
28. Hirano, T. (1990) *Neurosci. Lett.* **119**, 145-147.
29. Bodo, L., Jochen, K. and Heinrich, B. (1998) *J. NeuroSci.* **18**, 2954-2961.
30. Durand, G. M., Gregor, P., Zheng, X., Bennett, M. V. L., Uhl, G. R. and Zukin, R. S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9359-9363.
31. Durand, G. M., Bennett, M. V. L. and Zukin, R. S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6731-6735.
32. Zheng, X., Zhang, L., Durand, G. M., Bennett, M. V. L. and Zukin, R. S. (1994) *Neuron* **12**, 811-818.
33. Zukin, R. S. and Bennett, M. V. L. (1995) *Trends Neurosci.* **18**, 306-313.
34. Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishina, M. (1992) *NeuroReport* **3**, 1138-1140.
35. Sternberg, N. (1981) *J. Mol. Biol.* **150**, 467-486.
36. Torres, R. M. and Kuhn, R. (1997) Oxford University press Oxford
37. Li, Y., Erzurumlu, R., Chen, C., Jhaveri, S. and Tonegawa, S. (1994) *Cell* **76**, 427-437.
38. Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H. D., Sheng, M., Stewart, C., Mogarn, J., Connor, J., and Curran, T. (1994) *Neuron* **13**, 325-338.
39. Tsien, J., Huerta, P. Tonegawa, S. (1996) *Cell* **87**, 1327-1338.
40. Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., Natsume, R., Watanabe, M., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S., Arakawa, M., Takahashi, T., Nakamura, Y., Mori, H. and Mishina, M. (1996) *Neuron* **16**, 333-344.
41. Watkins, T. and Evan, J. (1981) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**, 165-170.
42. Stone, H. and Perkins, G. (1981) *Eur. J. Pharmacol.* **72**, 411-415.

43. Evans, T. (1982) *Br. J. Pharmacol.* **75**, 65-72.
44. Honore, H. (1988) *Science* **241**, 701-704.
45. Williams, K. (1997) *Cell Signal* **9**, 1-13.
46. Williams, K. (1997) *Biochem. J.* **325**, 289-297.
47. Williams, K. (1994) *Mol. Pharmacol.* **46**, 161-168.
48. Williams, K., Kashiwagi, K., Fukuchi, J. and Igarashi, K. (1995) *Mol. Pharmacol.* **48**, 1087-1098.
49. Traynelis, S. F., Hartley, M. and Heinemann, S. F. (1995) *Science* **268**, 873-876.
50. Traynelis, S. F., Burgess, M. F., Zheng, F., Lyuboslavsky, P. and Powers, J. L. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 6163-6175.
51. Kashiwagi, K., Fukuchi, J., Igarashi, K. and Williams, K. (1996) *Mol. Pharmacol.* **49**, 1131-1141.
52. Kashiwagi, K., Pahk, A. J., Masuko, T., Igarashi, K. and Williams, K. (1997) *Mol. Pharmacol.* **52**, 701-713.
53. Williams, K. (1993) *Mol. Pharmacol.* **44**, 851-859.
54. Williams, K., Rusell, S.L., Shen, Y. M. and Molinoff, P. B. (1993) *Neuron* **10**, 267-278.
55. Reynold, I. J. and Miller, R. J. (1989) *Mol. Pharmacol.* **36**, 758-765.
56. Legendre, P. and Westbrook, G. L. (1991) *Mol. Pharmacol.* **40**, 289-298.
57. Pahk, A.J. and Williams, K. (1997) *Neurosci. Lett.* **225**, 29-32.
58. Kashiwagi, K., Pistocchi, R., Shibuya, S., Sugiyama, S., Morikawa, K. and Igarashi, K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 12205-12208.
59. Kunkel, T., Roberts, J.D. and Zakour, R. A. (1987) *Methods Enzymol.* **154**, 367-382.
60. Sayers, J. R., Krekel, C. and Eckstein, F. (1992) *BioTechniques* **13**, 592-596.
61. Gallagher, M. J., Huang, H., Pritchett, D. B. and Lynch, D. R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9603-9611.
62. Kataoka, Y. and Ohmori, H. (1994) *J. Physiol.* **477**, 403-414.
63. Begg, E. J. and Barclay, M. L. (1995) *Br. J. Clin. Pharmacol.* **35**, 597-603.
64. Brummett, R. E. and Morrison, R. B. (1990) *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **116**, 406-410.
65. Basile, A. S., Huang, J.-M., Xie, C., Webster, D., Berlin, C. and Skolnick, P. (1996) *Nature Medicine* **2**, 1338-1343.
66. Lu, W.-Y., Xiong, Z.-G., Orser, B. A. and Macdonald, J. F. (1998) *J. Physiol.* **512**, 29-46.

67. Pullan, L. M., Stumpo, R. J., Powel, R. J., Paschetto, K. A. and Britt, M. (1992) *J. Neurochem.* **59**, 2087-2093.
68. Segal, J.A. and Skolnick, P. (1998) *Eur. J. Pharmacol.* **347**, 311-317.
69. Njus, J. H., Kelly, P. M. and Harnadek, G. J. (1986) *Biochem. Biophys. Acta.* **853**, 265-287.
70. Hell, J. W., Maycox, P. R., Stadler, H. and Jahn, R. (1988) *EMBO. J.* **7**, 3023-3029.
71. Kish, P. E., Fischer-Bonenkerk, C. and Ueda, T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3877-3881.
72. Taylor, P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4025-4028.
73. Iversen, L. L., (1971) *Br. J. Pharmacol.* **41**, 571-591.
74. Marton, L., Heby, O., Wilson, C. and Lee, P. (1974) *FEBS Letters* **46**, 305-307.
75. Marton, L., Heby, O., Levin, V., Lubich, W., Crafts, D. and Wilson, C. (1976) *Cancer Research* **36**, 973-977.
76. Kish, E. P. and Ueda, T. (1989) *Methods in Enzymol.* **174**, 9-25.
77. Krystyna, N. and Stanley, M. P. (1989) *J. Neurochem.* **52**, 913-920.
78. Elizabeth, J. F. and Graham, A. R. J. (1991) *J. Neurochem.* **57**, 911-914.
79. W.B.Huttner, W.Schiebler, P. and P. D. E. Camilli (1983) *J. Cell. Biol.* **96**, 1374-1388.
80. Asou, K. (1994) *Brain Medical* **6**, 13-22.
81. Raff, M. C. (1989) *Science* **243**, 1450-1455.
82. Igarashi, K., Kashiwagi, K., Hamasaki, H., Miura, A., Kakegawa, T., Hirose, S. and Matsuzaki, S. (1986) *J. Bacteriol.* **166**, 128-134.
83. Lowry, O. H., RoseBrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
84. Kakinuma, Y., Hosino, K. and Igarashi, K. (1988) *Eur. J. Biochem.* **176**, 409-414.
85. Kanai, Y., Hediger, M. A. (1992) *Nature* **360**, 467-471.
86. Pines, G. (1992) *Nature* **360**, 464-467.
87. Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. and Stoffel, W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10955-10959.
88. Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., Fairman, W. A., Wu, Y. N., Murdoch, G. H., North, R. A. and Amara, S. G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15329-15332.

要旨

【序論】 ポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）は、細胞増殖・分化に重要な生理的役割を果たす低分子塩基性生理活性物質である。このポリアミンの細胞増殖促進作用は主として核酸との相互作用で起こる。一方、脳は細胞増殖があまり活発でないにも係わらず、ポリアミン量は比較的多い。従って、脳におけるポリアミンは核酸以外の物質との相互作用により生理的役割を果たしていることが示唆されている。近年、このポリアミンのイオンチャンネルに対する役割が注目されている。グルタミン酸受容体の中でもNMDA（N-methyl-D-aspartate）受容体は記憶形成や脳虚血時の症状悪化に強く係わっており、ポリアミン、特にスペルミンによって脱分極時の促進、過分極時の阻害（チャンネルブロック作用）の両活性調節を受ける（Fig.1）。また、受容体の構造はNR1とNR2サブユニットそれぞれ2個から成るテトラマーであると考えられ、NR1は8種類（NR1A～NR1H）のスプライスバリエーションが存在し、NR2は4種類（NR2A～2D）の遺伝子が存在する。また、NR1Aサブユニット上にポリアミンの結合部位が存在することが示唆されていることより、我々はこれまでに、NR1Aサブユニットの酸性アミノ酸や芳香族アミノ酸、あるいはN616変異体の活性測定より、E342、W608、W611、N616、Y647、D669がスペルミンによる活性促進に、W563、N616、E621、D669がスペルミンによるチャンネルブロック作用に関与していることを明らかにしてきた。筆者は脳においてポリアミンがNMDA受容体活性を調節する生理的意義を明らかにすることを最終目的とし検討を行った。

1) NMDA受容体NR1サブユニット上の細胞外領域のスペルミン結合部位の同定

【目的】 ポリアミンが細胞外からNMDA受容体に作用することが示唆されていることから、今回は細胞表面に露出しているN末端領域及びM3-M4の後半領域のアミノ酸残基の関与について検討した。

【方法】 NMDA受容体のwild type及びアミノ酸置換cDNAより、*in vitro*でcRNAを合成し、*Xenopus*の卵母細胞に注入後、変異NMDA受容体を膜上に発現させ、グルタミン酸とグリシンの存在下で認められる電流をスペルミンによる促進効果の場合は-20 mV、チャンネルブロック作用の場合は-100 mVの電位固定法により測定した。

【結果】 NR1Aサブユニットの細胞表面に露出しているN末端領域のD170N、E181Q、E185Q、E297Q、D303N変異体及びM3-M4領域のD789N変異体においてスペルミンによる促進効果が低下した。スペルミンの促進効果は、pH感受性であり、生理的なpH条件下で受容体活性を測定した際に、プロトンによる阻害を解除することによって生じると考えられている。このプロトンの阻害はポリアミン結合部位に作用して起こ

ると考えられており、D170N、E181Q、E185Q、E297Q、D303N、D789N 変異体において、プロトンによる阻害の軽減が認められた。さらにこれらの変異体において、ポリアミン結合部位のアンタゴニストであるイフェンプロジルによる阻害も軽減された。NR1A D170、E181、E185 に対応するNR2Bサブユニット上のE191Q、E198Q、E201Q 変異体において、E191Q、E201Q 変異体でスペルミンによる促進効果の消失が認められた。これらのアミノ酸残基についてアラニン残基や異なる酸性アミノ酸残基に置換した変異体を作製して検討した結果、NR1A サブユニットのN末端領域において、D170、E297、E303、D789 についてアラニン残基に置換した変異体ではスペルミンの促進効果にあまり影響を与えなかった。NR1A E181、E185、NR2B E191、E201 はアラニン残基に置換した変異体において、スペルミンによる促進効果の減少が認められた。従って、これらのNR1A E181、E185、NR2B E191、E201 がスペルミンによる促進に強く関与するアミノ酸残基であり、アスパラギン酸残基に置換した変異体ではスペルミンによる促進効果に影響を与えないことから、グルタミン酸残基であることが重要であると考えられる。次に、スペルミンのチャンネルブロック作用を阻害効果のみを示す N^1 -dansyl-spermine を用いて検討した結果、N末端領域のD198N 変異体及びM3-M4領域のE781Q 変異体で阻害効果の減少が認められた。しかし、D198、E781 について他のアミノ酸残基に置換した変異体では、スペルミンによるチャンネルブロック作用の軽減が認められなかった。現在まで、明らかになったポリアミンによる活性促進に関与するアミノ酸残基は、すべてイフェンプロジルによる阻害が弱いながら解除されていたため、ポリアミンとイフェンプロジルの結合部位は重複していると考えられていた。しかし、N末端領域のD130N 変異体において、ポリアミンの促進効果にはほとんど影響を示さないにもかかわらず、イフェンプロジルの阻害効果が完全に消失した。従って、D130はイフェンプロジル特異的な結合部位に関与するアミノ酸残基であることが明らかとなった。また、NR1A D130に対応するNR2B D136N 変異体ではイフェンプロジルの阻害の解除は認められなかった。NR1A サブユニットのこの領域について詳細に検討した結果、S108A、Y109L、F113L、Y114L 変異体においても同様にイフェンプロジルの阻害効果の消失が認められた。

【結論】NMDA 受容体(NR1A/NR2B)の細胞外領域において、NR1A E342、D669の他にNR1A E181、E185、NR2B E191、E201 がスペルミンの促進効果に強く関与するアミノ酸残基であることが明らかとなった。また現在までの結果より、脱分極時にはスペルミンは膜表面に結合して促進作用を示し、過分極の時はチャンネル・ポア内部に移動して、阻害効果を示すことが示唆された。また、ポリアミン部位のアンタゴニストであるイフェンプロジルの特異的な結合にN末端のNR1A S108、Y109、F113、Y114、D130のアミノ酸残基が重要であることが示唆された。

2) NMDA受容体に及ぼすアミノグリコシド系抗生物質の効果

【目的】ネオマイシンやカナマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質は強い抗菌作用を示すが、一方で聴覚障害などの副作用を起こすことからその使用が限られている。これらの抗生物質によって引き起こされた聴覚障害が、NMDA受容体のポリアミン結合部位に結合して受容体活性を阻害するイフェンプロジルによって緩和されるという報告があることから、アミノグリコシド系抗生物質のNMDA受容体に及ぼす影響について検討した。

【結果】アミノグリコシド系抗生物質の作用のNR2サブユニット(NR2A~2D)特異性を-20 mVの脱分極状態で検討した結果、200 μ Mネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシンにより、ポリアミンと同様にNR2Bサブユニット特異的に促進効果を示した。また、NR1A/NR2B受容体に対するアミノグリコシド系抗生物質の影響は、アミノ基の数が多き抗生物質ほど強い促進効果が認められた。アミノグリコシド系抗生物質はポリアミンと同様にNR1A/NR2B受容体に対するグルタミン酸の親和性を低下させたが、グリシンの親和性には影響を与えなかった。さらにプロトンによるチャンネル活性阻害の軽減も認められた。各種アミノグリコシド系抗生物質によって増強されたチャンネル活性に及ぼすイフェンプロジルの影響について検討した結果、コントロールと同程度まで阻害されることが明らかとなった。次にNR2A、NR2Bサブユニットに対するアミノグリコシド系抗生物質の影響を-20 mVと-100 mVの固定電位で測定した結果、ポリアミンと同様に脱分極時の促進と過分極時の阻害の傾向が認められた。しかし、チャンネルブロック作用の強さは構造による一定の傾向が認められなかった。さらにNR1Aサブユニット上のポリアミンによる促進に関与する部位の変異体(NR1A E181Q/E185Q、E342Q、N616Q、W608L、D669N)を用いた際、アミノグリコシド系抗生物質の促進効果の消失が認められた。また、NR1Aサブユニット上の阻害に関与する部位の変異体(W563L、N616Q、E621Q、D669N)を用いた際に、N616Q及びE621Q変異体では、すべてのアミノグリコシド系抗生物質で阻害効果の軽減が認められた。しかし、他の変異体では一定の傾向は認められなかった。次にイフェンプロジルにのみに関与する部位の変異体(NR1A Y109L、Y114L、D130N)を用いて検討した結果、1 μ Mイフェンプロジルによる阻害効果の消失は認められるが、抗生物質による促進効果には影響を与えなかった。

【考察】アミノ基の多いアミノグリコシド系抗生物質ほどNR1A/NR2B受容体活性を強く促進することが明らかとなった。また、アミノ基が3個以上のアミノグリコシド系抗生物質はNR1A/NR2B受容体のイフェンプロジル特有の結合部位には結合せず、スペルミンによる促進効果に関与する結合部位に作用することにより、受容体を過剰興奮させ、聴覚障害を引き起こすことが示唆された。

3) 神経系におけるポリアミン輸送

【目的】 *Xenopus* の卵母細胞を用いた電気生理学的実験によりポリアミンは細胞外からNMDA 受容体活性を促進することが示唆されている。そのため、シナプス間隙においてポリアミンがどのような機構で放出され、NMDA 受容体活性を促進した後、どのような不活性化機構が存在するかを明らかにすることを目的とした。

【方法】 ラットからシナプス小胞画分及びアストログリアの初代培養細胞を調製し、¹⁴C スペルミン及びスペルミジンのシナプス小胞及びアストログリア細胞への取り込み活性を検討した。

【結果】 ポリアミンがシナプス間隙に常時存在するかどうかを明らかにするためシナプス間隙を満たしている脳脊髄液のポリアミン定量を行ったが、ポリアミンは検出できなかった。しかし、細胞膜画分に比べシナプス小胞体画分において2.5倍以上のスペルミンの蓄積が認められた。さらに、シナプス小胞に対するスペルミン、スペルミジンの取り込み活性を測定した結果、スペルミン、スペルミジン共にATP依存性の取り込み活性が認められた。また、スペルミン、スペルミジン取り込みのK_m値は、それぞれ62 μM、483 μMで、スペルミンの方が優先的にシナプス小胞に取り込まれることが明らかとなった。また競合阻害実験より、同一の輸送系で取り込まれている可能性が示された。次にエキソサイトーシスにより放出されたポリアミンの不活性化機構について検討するため、神経細胞の神経終末の閉じた袋状の顆粒であるシナプトソーム画分を調整し、スペルミン、スペルミジンの取り込みを検討したが、取り込み活性は検出できなかった。次に、シナプス間隙に接しているアストログリア細胞の初代培養系を用い、スペルミン、スペルミジンの取り込み活性を検討した結果、エネルギー依存的な取り込み活性が検出された。

【考察】 ポリアミンは興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸と同様に、シナプス小胞体に蓄積され、神経終末にインパルスが到達するとエキソサイトーシスでシナプス間隙に放出される。NMDA 受容体活性を促進した後、主にグリア細胞に取り込まれることで不活性化されるという機構が存在することが示唆された。

論文目録

- 1) Williams, K., Chao, J., Kashiwagi, K., Masuko, T. and Igarashi, K. Activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors by glycine: role of an aspartate residue in the M3-M4 loop of the NR1 subunit. *Mol. Pharmacol.* 50, 701-708 (1996)
- 2) Chao, J., Seiler, N., Renault, J., Kashiwagi, K., Masuko, T., Igarashi, K. and Williams, K. *N*¹-Dansyl-spermine and *N*¹-(*n*-octansulfonyl)-spermine, novel glutamate receptor antagonists: block and permeation of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.* 51, 861-871 (1997)
- 3) Kashiwagi, K., Park, J. Albert, Masuko, T., Igarashi, K. and Williams, K. Block and modulation of *N*-methyl-D-aspartate receptors by polyamines and protons: role of amino acid residues in the transmembrane and pore-forming regions of NR1 and NR2 subunits. *Mol. Pharmacol.* 52, 701-713 (1997)
- 4) Williams, K., Kashiwagi, K., Pahk, A. J., Masuko, T., Nguyen, N. D., and Igarashi, K. The selectivity filter of the NMDA channel: critical role of a tryptophan residue in block and permeation of Mg²⁺. *Mol. Pharmacol.* 53, 933-941 (1998)
- 5) Masuko, T., Kuno, T., Kashiwagi, K., Nguyen, N.D., Pahk, A.J., Fukuchi, J., Igarashi, K. and Williams, K. spermine, protons and Ifenprodil: binding sites and interactions in the amino terminal domain of the *N*-methyl-D-aspartate receptor. submitted to *Mol. Pharmacol.*
- 6) Masuko, T., Kuno, T., Kashiwagi, K., Kusama, T., Williams, K. and Igarashi, K. Agonist properties of aminoglycoside antibiotics at *N*-methyl-D-aspartate receptor. in preparation

謝辞

本研究を進めるに当たり数々の御指導を承りました五十嵐一衛教授に心から感謝致します。また本研究を遂行するに当たり、御指導と御助言をくださいました柿沼喜巳助教授、柏木敬子助手に深く感謝致します。

また、大変お世話になりました臨床化学研究室の皆様に感謝致します。

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査員により行われた。

| | | |
|----|-----------------|-------|
| 主査 | 千葉大学教授（薬学部）薬学博士 | 五十嵐一衛 |
| 副査 | 千葉大学教授（薬学部）薬学博士 | 千葉 寛 |
| 副査 | 千葉大学教授（薬学部）薬学博士 | 堀江利治 |
| 副査 | 千葉大学教授（薬学部）薬学博士 | 矢野真吾 |
| 副査 | 千葉大学教授（薬学部）薬学博士 | 渡辺和夫 |