Characterization of High Affinity Mg2+ and Polyamine Recognition Sites on the NMDA Receptor Ion Channel Complex

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8417

金沢大学十全医学会雑誌 第102巻 第1号 28－38 (1993)

N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型受容体イオンチャンネル複合体における高親和性 Mg^{2+} 結合部位とポリアミン結合部位の特性

金沢大学医学部公衆衛生学講座（主任：岡田 晃教授）
長 瀬 博 文

（平成5年1月6日受付）

近年，興奮性アミノ酸受容体の1つの亜型である N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 型受容体が，神経生理学的または神経病理学的プロセスに幅広く関与していることから，特に注目されるようになってきている．この受容体は，L-グルタミン酸，グリシン，(+)-5-methyl-10, 11-dihydro-5H-dibenzo [a, d] cyclohepten-5, 10-imine maleate (MK-801) と N-(1- [2-thienyl] cyclohexyl)-3, 4-piperidine (TCP)，Mg^{2+}，スペルミンとスペルミジンといったポリアミンなど多くの受容体調節物質を認識する部位を含んだイオンチャンネル複合体と考えられている．本研究では，NMDA 型受容体複合体を調節する高親和性 Mg^{2+} 結合部位およびポリアミン結合部位の特性を調べるため，Mg^{2+}，ポリアミン，ポリアミンアンタゴニストおよびアミノ酸との相互作用を ^{3}H-TCP 結合実験にて検討した．1 μM スペルミジンと 0.5μM スペルミンは，Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激を相加的にさらに増加させていた．しかし，より高濃度のスペルミンとスペルミジンは，相加的に ^{3}H-TCP 結合を増加させなかった．Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激の場合と異なり，今回検討した濃度のポリアミンは，L-グルタミン酸による ^{3}H-TCP 結合の刺激を各々相加的に増加させていた．これは，ポリアミンが NMDA 型受容体複合体において，L-グルタミン酸結合部位とは異なる部位を介して ^{3}H-TCP 結合を刺激していることを示している．10μM L-グルタミン酸と 10μM グリシンは，^{3}H-TCP 結合を刺激するスペルミンの親和性を各々が同程度に増加させる一方で，L-グルタミン酸は ^{3}H-TCP 結合を刺激する Mg^{2+} の親和性をグリシンより著明に強く増加させていた．また，ポリアミンアンタゴニストである diethylenetriamine (DET) とプトレッシンは，Mg^{2+} とスペルミンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合をどちらも競合的に抑制した．これらの相反する結果は，Mg^{2+} とスペルミンが同じ機序で ^{3}H-TCP 結合を刺激しないことを示している．さらには，Mg^{2+} とポリアミンが高親和性 Mg^{2+} 結合部位とポリアミン結合部位という2つの別々な調節部位を介して NMDA 型受容体複合体を調節している可能性も示唆している．加えて，アルカインと 1, 10-diaminodecane (DA10) は 1 μM L-グルタミン酸，100μM Mg^{2+} と 1 μM スペルミンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合を濃度依存性に各々抑制した．それら抑制の効力は，明らかに DET より高いものであった．10μM DET は，L-グルタミン酸とグリシンによる ^{3}H-TCP 結合の刺激に対するアルカインと DA10 の抑制効果を減弱させていた．これらの結果は，アルカインが DA10 と同じ作用を持つポリアミン結合部位へのインバースアゴニストであることを示していた．

Key words NMDA receptor ion channel complex, high affinity Mg^{2+} site, polyamine recognition site, polyamine antagonists, inverse agonist

興奮性アミノ酸受容体は，高等動物の中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質受容体であり，シナプスでの神経情報伝達に中心的役割を担っている．それと共に，記憶と学習の基礎になるシナプス可塑性の発現，脳虚血やてんかん重積発作による神経細胞壊死，精神分裂病や痴呆などの病態に深く関わっていることも示唆されている[1]．よってこの受容体の機能の解明は，神経情報伝達や脳の高次機能，病態の理解に必須である．特に本研究では，興奮性アミノ酸受容体を調節する機能が最近明らかにされてきた Mg^{2+} とポリアミン[2]に注目し，それらの調節部位の特性を検討したが，これらの調節機能を明らかにすることで興奮性アミノ酸受容体が病態に関わる多くの疾病，異常[3]の予防につながっていくと考えられる．

興奮性アミノ酸受容体は選択的なアゴニストに基づいて，N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 型，キスカル酸型，カイニン酸型の3つの亜型に分類されてきた[1]．特に NMDA 型受容体は Na^+, K^+, Ca^+ などのイオンが通過する陽イオンチャンネルと共役し複合体を形成し機能している[4]．その受容体複合体は，それ自身の機能を調節する特異的な部位を有しており，特に L-グルタミン酸とグリシンを別々に認識する部位（調節部位または結合部位）が存在すると

Abbreviations: DA10, 1,10-diaminodecane; DET, diethylenetriamine; EDTA, ethylenediamineteraacetate; ^{3}H-MK-801, ^{3}H-(+)-5-methyl-10, 11-dihydro-5H-dibenzo [a, d] cyclohepten-5, 10-imine maleate; ^{3}H-TCP, ^{3}H-N-(1- [2-thienyl] cyclohexyl)-3, 4-piperidine; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PCP, phencyclidine

考えられている[4]．また，フェンサイクリジン (phencyclidine, PCP)，ケタミン，(+)-5-methyl-10, 11-dihydro-5H-dibenzo [a, d] cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801) などのいくつかの幻覚惹起物質が，アミノ酸の結合部位とは別の部位に作用することも知られている[5)~7)]．電気生理学的実験からその結合部位は NMDA 型受容体複合体の中のイオンチャンネル内かまたは，それと親密な関係がある部位と考えられている[8)]．受容体結合実験では，よく洗浄した膜標品への ^{3}H-MK801 結合が，L-グルタミン酸やグリシンによって著明に促進されており[5)6)]，^{3}H-MK801 は NMDA 型受容体内のイオンチャンネルが開放した状態に特異的に結合すると考えられている．また本研究で使用した PCP のアナログの ^{3}H-N-(1- [2-thienyl] cyclohexyl)-3, 4-piperidine (^{3}H-TCP) も ^{3}H-MK801 と同一の部位に結合するとされており[9)]，膜標品への ^{3}H-MK801 や ^{3}H-TCP の結合は NMDA 型受容体イオンチャンネル複合体の機能を反映していると考えられる．

近年，スペルミンやスペルミジンといったポリアミンが L-グルタミン酸とグリシンの最大効果が得られる濃度の存在下で，さらに ^{3}H-MK801 結合を促進させることが報告された[10)]．さらにポリアミンの構造活性相関に関する研究では，NMDA 型受容体への ^{3}H-MK801 結合の効果に基づいて，スペルミンやスペルミジンはポリアミンの結合部位へのアゴニストとして分類され，ジエチレントリアミン (diethylenetriamine, DET) はポリアミンの結合部位への選択的かつ競合的アンタゴニストとして分類された[11)]．これらの所見より NMDA 型受容体複合体において，アミノ酸結合部位とは区別される特異的な結合部位にポリアミンが作用することが明らかになってきている．

また 1 mM 以上の高濃度の Mg^{2+} が，^{3}H-PCP 結合を抑制することや[12)]，^{3}H-TCP 結合を抑制することが受容体結合実験で示され[13)14)]，電気生理学的な研究においても Mg^{2+} が NMDA アゴニストによって活性化されたコンダクタンスを電位依存性 (voltage-dependent) にブロックすることが明らかにされている[15)~19)]．これらの所見は，Mg^{2+} の結合部位が NMDA 型受容体複合体のイオンチャンネル内に存在することを示している．

一方で，興奮性アミノ酸やポリアミンと同様に 1 mM 以下の低濃度の Mg^{2+} も，よく洗浄した膜標品への ^{3}H-TCP 結合を刺激することがわかってきた[13)14)20)21)]．Hori らは，Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激が，最大効果の得られる濃度の L-グルタミン酸とグリシンの刺激による特異的 ^{3}H-TCP 結合に相加的であることを示し，L-グルタミン酸やグリシンのみならずイオンチャンネル内在の低親和性の Mg^{2+} 結合部位とも区別される新しい部位として，高親和性 Mg^{2+} 結合部位を提唱した[13)21)]．

しかし，現在まで高親和性 Mg^{2+} 結合部位についての検討は十分になされておらず不明な点も多い．Sacaan と Johnson は，Mg^{2+} とポリアミンが同一部位に作用し ^{3}H-TCP 結合を刺激している可能性を指摘している[22)]．一方で Wong らは Mg^{2+} とポリアミンが各々が異なる部位に作用して ^{3}H-MK801 結合を刺激することを示唆している[23)]．このように NMDA 型受容体複合体を調節する Mg^{2+} とポリアミンの調節部位 (結合部位) の相互関係については一致した見解が得られておらず検討の余地が多く残されている．そこで本研究では，高親和性 Mg^{2+} 結合部位とポリアミン結合部位の特性を ^{3}H-TCP 結合実験によって検討した．

材料および方法

Ⅰ．薬　品

本研究で使用したリガンドおよび薬品は以下の通りである．^{3}H-TCP (49.7Ci/mmol) (New England Nuclear, Boston, MA, USA)；PCP (塩野義製薬会社，大阪)；スペルミン，スペルミジン，プトレッシン，アルカイン，1,10-diaminodecane (DA10) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)；DET (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, MI, USA)

Ⅱ．実験方法

1．膜標品の作成

Wistar 系雄性ラット (140－210g) を用い，Hori らの方法[13)]に従い膜標品を作成した．断頭後直ちに脳を取り出し，大脳皮質を20倍量相当の 0.32M ショ糖でホモジネートし，900xg，10分間，4℃にて遠心した．上清を再びホモジネートした後，20,000xg，20分間，4℃で遠心して沈渣部分 (P2 分画) を得た．P2 分画中に残存する内因性アミノ酸などを可能な限り除去するため，以下に述べる操作を P2 分画に加えた．まず，P2 分画を20倍量の 50mM Tris-HCl pH 7.6/10mM エデテート (ethylenediaminetetraacetate, EDTA) 緩衝液 (Tris-EDTA 緩衝液) でホモジネートし，20,000xg，20分間，4℃の遠心を行った．得られた沈渣を20倍量の Tris-EDTA 緩衝液で再びホモジネートし37℃，10分間のプレインキュベーションをした後，上述した条件で 2 回目の洗浄・遠心を行った．次に，ここで得られた沈渣を20倍量の Tris-EDTA 緩衝液でホモジネートし，ドライアイスを用いて凍結・融解 (freezing-thawing) をし，3 回目の洗浄・遠心を行った．最後に得られた沈渣は20倍量の 5mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) でホモジネートし－80℃で保存した．実験当日，凍結保存した膜標品は室温で融解した後，20倍量の 5mM Tris-HEPES 緩衝液 (pH 7.6) を用いて，20,000xg，20分間，4℃で 2 回洗浄・遠心し結合実験に供した．

2．^{3}H-TCP の結合実験

^{3}H-TCP の結合実験は，Loo らの方法に従い実施した[24)]．具体的には，まず膜標品 (蛋白量 10μg) は，5nM ^{3}H-TCP と必要に応じた試薬と共に 5mM Tris-HEPES 緩衝液 (pH 7.6) 中で最終全体量 200μl，25℃にて 2 時間インキュベーションした．この反応は 2 時間後，Inotech セルハーベスター (Wohlen, Switzerland) を用いて Whatman GF/C フィルター (Brandel, Gaithersburg, Germany) 上に吸引濾過することにより急速に停止させた．その後 Whatman GF/C フィルターは，未結合の ^{3}H-TCP を除去するため氷冷した 5mM Tris-HEPES 緩衝液 200μl で10回洗浄した．なお，Whatman GF/C フィルターは非特異的吸着を防止するため，予め0.05％ポリエチレンイミン (polyethyleneimine) に15－20分間浸して使用した．

3．放射活性の測定

^{3}H-TCP 結合実験で得られたフィルターは，液体シンチレーションカウンター用バイアル (Biovial) (Beckman, Fullerton, CA, U. S. A.) に入れシンチレーターとしてアクアゾール (New England Newclear, Boston, MA, U. S. A.) 3ml を加え，その放射活性を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS9800) を用いて測定した．特異的結合は 30μM PCP 存在下および非存在下の差として求めた．なお全ての実験は triplicate で行った．

4．蛋白量の測定

使用した膜標品の蛋白量は，Lowry らの方法[25]に従って測定した．標準曲線の作成にはウシ血清アルブミン（岩井化学薬品，東京）を用いた．

5．統計学的処理

EC_{50} および IC_{50} は，Hill plot の線形回帰より算出した．平均値の比較には Student の t 検定（両側）を用い，P 値が0.05以下を有意差ありとした．

成　　績

I．Mg^{2+} または L-グルタミン酸によって刺激された ^{3}H-TCP 結合へのスペルミジンとスペルミンの効果

Mg^{2+} は特異的 ^{3}H-TCP 結合を濃度依存性に増加させ，30－100μM で結合量は最大となり，Mg^{2+} 非存在下の結合量に比して約6倍まで達した．一方 100μM 以上の高濃度の Mg^{2+} はその結合を抑制した（図 1A）．この Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合への二相性の効果は，諸家の報告[13)14)20)24)]と一致するものである．

図 1A と 1B に示したように，1 μM スペルミジンと 0.5 μM のスペルミンは，Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激をさらに相加的（additive）に増加させた．同様に 3 μM と 10μM スペルミジンおよび 1 μM と 3 μM のスペルミンも Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激をさらに増加させたが，相加的増加ではなかった．Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合増加に対する EC_{50} 値は，ポリアミン非存在下の 11.4±3.14μM（平均±標準誤差；n＝4）から 3 μM スペルミジン存在下の 9.37±1.75μM へと，また 1 μM のスペルミン存在下では 8.53±1.75μM へと減少したが統計学的に有意ではなかった（表 1）．

図 1C と 1D に示したようにL-グルタミン酸は特異的 ^{3}H-TCP 結合を濃度依存性に増加させ 10－100μM で最大結合量が得られ，L-グルタミン酸非存在下の結合量に比して約8倍まで達した．スペルミジンやスペルミンは，L-グルタミン酸による ^{3}H-TCP 結合刺激をさらに相加的に増加させた．L-グルタミン酸による ^{3}H-TCP 結合増加に対する EC_{50} 値では，ポリアミン非存在下の 229.9±51.3nM（平均±標準誤差；n＝4）から 1 μM スペルミジン存在下の 39.6±2.2nM（$p<0.05$）へと，また 0.5μM のスペルミン存在下の 39.2±2.5nM（$p<0.05$）へと

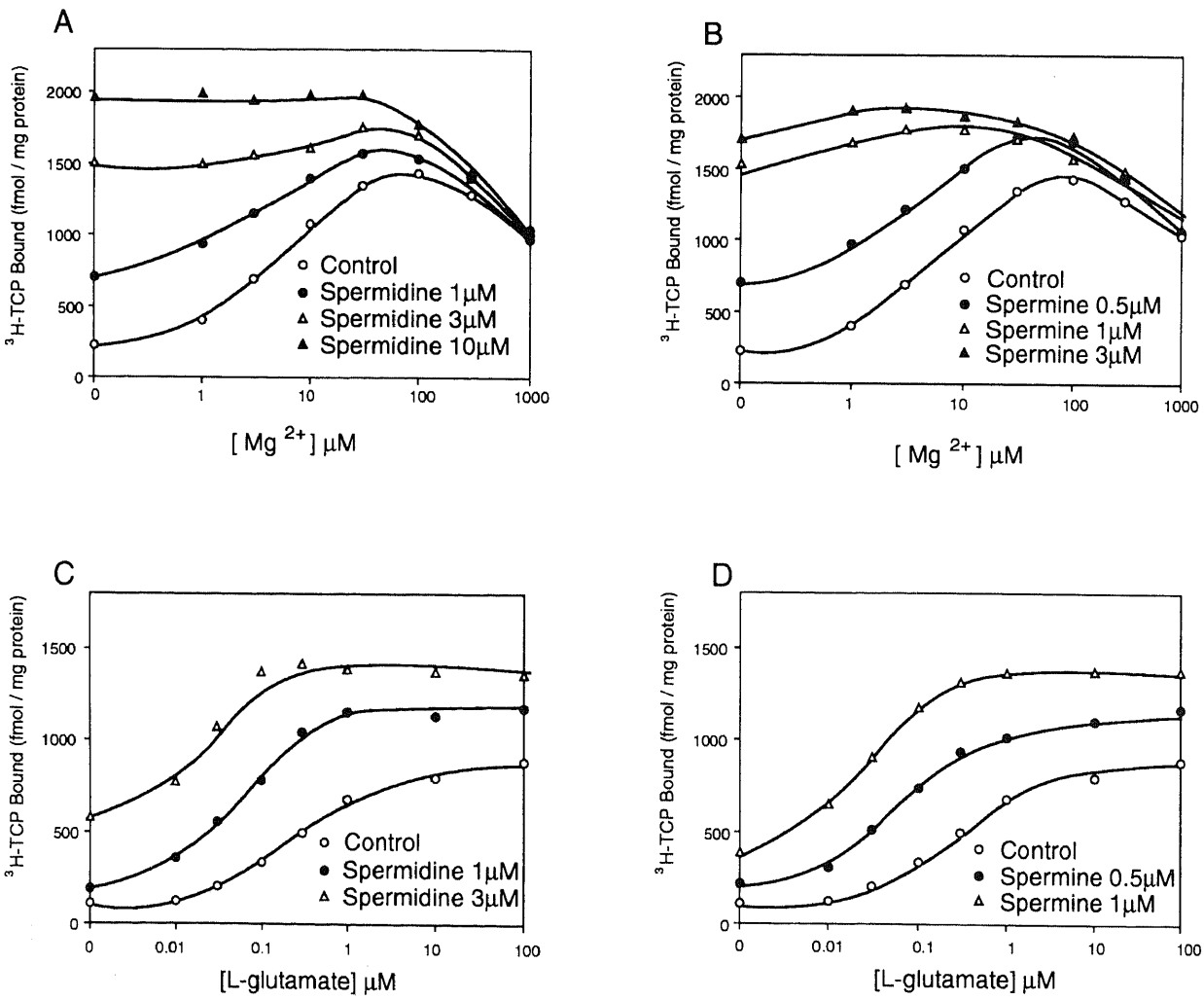


Fig. 1. The effects of spermidine and spermine on the Mg^{2+}- and L-glutamate-induced ^{3}H-TCP binding. Concentration-response curves for Mg^{2+} (A, B) and L-glutamate (C, D) were determined under the control conditions (open circles) and in the presence of 1 μM (closed circles), 3 μM (open triangles), or 10 μM (closed triangles) spermidine (A, C); and 0.5 μM (closed circles), 1 μM (open triangles), or 3 μM (closed triangles) spermine (B, D). Results are the average of triplicate determinations from a representative experiment that was repeated 4 times giving similar results.

有意に減少した (表1).

Ⅱ. Mg^{2+} およびスペルミンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合に対してのアミノ酸の効果

10μM L-グルタミン酸および10μM グリシンといったアミノ酸の存在下で, Mg^{2+} とスペルミンの ^{3}H-TCP 結合刺激効果を検討した.

データは示していないが, 0.01－1 μM のスペルミンは L-グルタミン酸 (10μM) またはグリシン (10μM) の存在下で ^{3}H-TCP 結合を刺激した. スペルミンによる ^{3}H-TCP 結合増加に対しての EC_{50} 値は, アミノ酸非存在下の 1.58±0.15μM (平均±標準誤差; n=3) から 10μM L-グルタミン酸存在下の 0.48±0.06μM へと, また 10μM グリシン存在下の 0.68±0.01μM へと各々減少した (表2). 一方で, 本研究と同一の実験系で得られた Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合増加においてはアミノ酸非存在下の 11±2.1μM (平均±標準誤差) から 10μM L-グルタミン酸存在下の 1.9±0.6μM と, また 10μM グリシン存在下の 8.4±1.1μM へと各々減少した[13]. Mg^{2+} またはスペルミンのみによる ^{3}H-TCP 結合増加に対する対照の EC_{50} 値とアミノ酸存在下における各々の EC_{50} 値の比較検討を行うと, スペルミンによる ^{3}H-TCP 結合増加に対しての EC_{50} 値では, 対照：+10μM L-グルタミン酸：+10μM グリシン＝1：0.30：0.43, Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合増加に対しての EC_{50} 値では, 対照：+10μM L-グルタミン酸：+10μM グリシン＝1：0.17：0.76であった (表2).

Ⅲ. Mg^{2+} またはスペルミンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合に対するポリアミンアンタゴニストの抑制

Mg^{2+} またはスペルミンで刺激された ^{3}H-TCP 結合を抑制する一連のポリアミンアンタゴニスト, アルカイン, DA10, DET, プトレッシンの効力を検討した. 本実験で全てのポリアミンアンタゴニストは, 最大刺激効果が得られる 100μM Mg^{2+} 存在下での ^{3}H-TCP 結合を濃度依存性に抑制した (図2). その抑制効力の順序は, アルカイン (IC_{50}=6.80±0.11μM)>DA10 (IC_{50}=10.7±2.54μM)>DET (IC_{50}=14.0±3.32μM)>プトレッシン (IC_{50}=53.8±6.73μM) であった (表3). またデータは示さないが, 最大効果が得られる1μM スペルミンによる ^{3}H-TCP 結合刺激に対しても同様な結果が得られ, しかもポリアミンアンタゴニストの効力の順序も Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激を抑制する場合と同一であった.

Table 1. Effects of polyamines on Mg^{2+}-and L-glutamate-induced ^{3}H-TCP-binding[1-3]

Modulator	Condition		EC_{50}	
Mg^{2+}	Control		11.4±3.14	
	+Spermidine	(3μM)	9.37±1.75	
	+Spermine	(1μM)	8.53±1.75	
				(μM)
L-glutamate	Control		229.9±51.3	
	+Spermidine	(1μM)	39.6± 2.2	*
	+Spermine	(0.5μM)	39.2± 2.5	*
				(nM)

[1] Extensively washed synaptic membranes were incubated with 5nM ^{3}H-TCP and various concentrations of $MgSO_4$ (1-1,000μM) in the absence or presence of either 3μM spermidine or 1μM spermine, or various concentrations of L-glutamate (0.01-100μM) in the absence or presence of either 1μM spermidine or 0.5μM spermine. The EC_{50} were derived from linear regression analysis of Hill plots. The binding assay was performed in triplicate.
[2] Each value represents the mean±SEM calculated from four experiments.
[3] Statistical analysis was performed using Student's t-test.
* $p<0.05$

Table 2. Effects of L-glutamate and glycine on Mg^{2+}-and spermine-induced ^{3}H-TCP-binding[3]

Modulator	Condition		EC_{50} (μM)	Ratio
Spermine	Control		1.58±0.15	1
	+L-glutamate	(10μM)	0.48±0.06	0.30
	+Glycine	(10μM)	0.68±0.01	0.43
Mg^{2+} [2]	Control		11±2.1	1
	+L-glutamate	(10μM)	1.9±0.6	0.17
	+Glycine	(10μM)	8.4±1.1	0.76

[1] Extensively washed synaptic membranes were incubated with 5nM ^{3}H-TCP and various concentrations of spermine (0.01-100μM) in the absence or presence of either 10μM L-glutamate or glycine. The EC_{50} were derived from linear regression analysis of Hill plots. The binding assay was performed in triplicate.
[2] Data from reference of Hori et al., 1990
[3] Each value represents the mean±SEM calculated from more than three experiments.

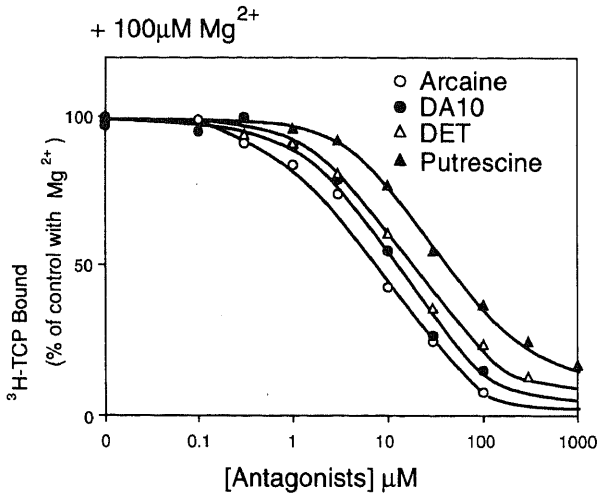


Fig. 2. Inhibition of polyamine antagonists on the Mg^{2+}-induced ^{3}H-TCP binding. The effects of increasing concentrations of polyamine antagonists, arcaine (open circles), DA10 (closed circles), DET (open triangles), and putrescine (closed triangles) on the ^{3}H-TCP binding enhanced by 100 μM Mg^{2+} were determined. Results are the average of triplicate determinations from a representative experiment that was repeated 3 times giving similar results.

Ⅳ. Mg^{2+} またはスペルミンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合への DET またはプトレッシンの効果

ポリアミンアンタゴニストである DET およびプトレッシンの，Mg^{2+} とスペルミンによる ^{3}H-TCP 結合刺激に対する抑制効果について更に検討した．図 3A と図 3B に示す如く，

Table 3. Effects of putaive polyamine antagonists on the enhancement of ^{3}H-TCP binding by Mg^{2+} [1-2].

Saturating Condition	Mg^{2+}(100μM)	
Antagonists	IC_{50} (μM)	Hill Coefficient
Arcaine	6.80±0.11	0.94
1.10-Diaminodecane	10.7±2.54	1.15
Diethylenetriamine	14.0±3.32	0.68
Putrescine	53.8±6.73	0.67

[1] Extensively washed synaptic membranes were incubated with 5nM ^{3}H-TCP and various concentrations of putative polyamine antagonists (0.01-1000μM) in the presence of $MgSO_4$ (100μM). The IC_{50} were derived from linear regression analysis of Hill plots. The binding assay was performed in triplicate.

[2] Each value represents the mean±SEM calculated from three experiments.

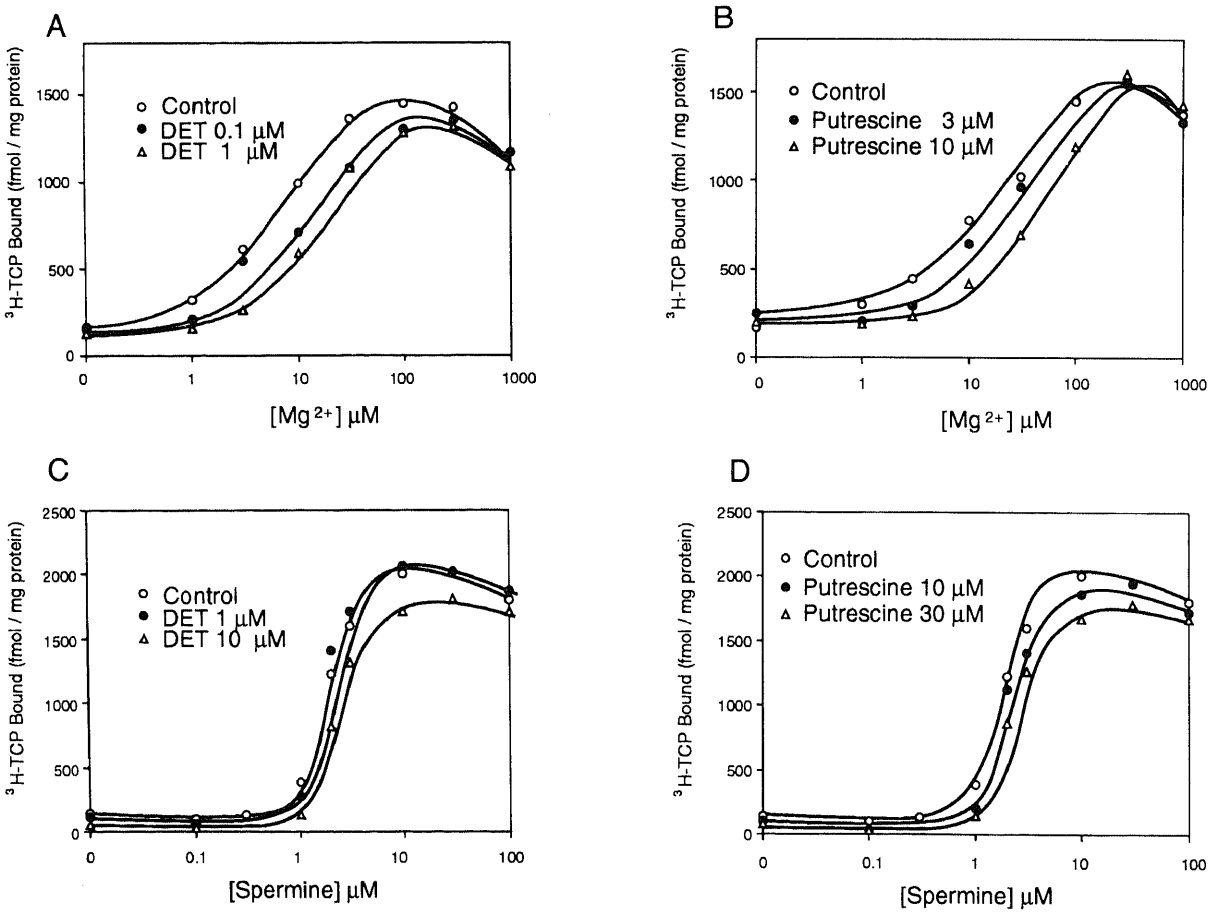


Fig. 3. The effects of DET and putrescine on the Mg^{2+}- and spermine-induced ^{3}H-TCP binding. Concentration-response curves for Mg^{2+} (A, B) and spermine (C, D) were determined under control conditions (open circles) and in the presence of 0.1 μM (closed circles) or 1 μM (open triangles) DET (A); 1 μM (closed circles) or 10 μM (open triangles) DET (C); 3 μM (closed circles) or 10 μM (open triangles) putrescine (B); and 10 μM (closed circles) or 30 μM (open triangles) putrescine (D). Results are the average of triplicate determinations from a representative experiment that was repeated 3 times giving similar results.

DET とプトレッシンは Mg^{2+} によって刺激された ^{3}H-TCP 結合を競合的に刺激していた．スペルミンによる ^{3}H-TCP 結合刺激作用に対しても DET，プトレッシンは，同様に競合的な抑制を示していた (図 3C, 3D)．

V．L-グルタミン酸によって刺激された ^{3}H-TCP 結合に対するポリアミンアンタゴニストの抑制

1 μM L-グルタミン酸によって刺激された ^{3}H-TCP 結合に対するポリアミンアンタゴニストの効果は，その反応によって2群に分かれた．アルカインと DA10 は濃度依存性に ^{3}H-TCP 結合を完全に抑制したが，DET とプトレッシンは L-グルタミン酸のみによって刺激された ^{3}H-TCP 結合を完全に抑制できなかった．L-グルタミン酸の ^{3}H-TCP 結合刺激効果を抑制する効力の順序は，アルカイン (IC_{50}=0.51±0.037 μM)>DA10 (IC_{50}=0.73±0.137 μM)>DET，プトレッシン (IC_{50}>50 μM) であった (表4)．

VI．アルカインと DA10 の L-グルタミン酸とグリシンによる ^{3}H-TCP 結合刺激の抑制に対しての DET の効果

Table 4. Effects of putaive polyamine antagonists on the enhancement of ^{3}H-TCP binding by L-glutamate[1-2]

Saturating Condition	L-glutamate (1μM)	
Antagonists	IC_{50} (μM)	Hill Coefficient
Arcaine	0.51±0.037	0.65
1.10-Diaminodecane	0.73±0.137	0.94
Diethylenetriamine	>50	
Putrescine	>50	

[1] Extensively washed synaptic membranes were incubated with 5nM ^{3}H-TCP and various concentrations of putative polyamine antagonists (0.01-1000μM) in the presence of L-glutamate (1μM). The IC_{50} were derived from linear regression analysis of Hill plots. The binding assay was performed in triplicate.
[2] Each value represents the mean±SEM calculated from three experiments.

アルカインと DA10 がポリアミン結合部位に同じ機序で作用しているかどうかを見るため，両アンタゴニストによる ^{3}H-TCP 結合の抑制に対する DET の効果を，L-グルタミン酸とグリシン存在下で検討した．L-グルタミン酸とグリシンの ^{3}H-TCP 結合刺激の DA10 による抑制は，10μM DET によって著しく減弱された (図 4B)．これは以前の報告[26]とよく一致するものであった．同じように，DET はアルカインによる ^{3}H-TCP 結合刺激の抑制も濃度依存性に減弱させた (図 4A)．

VII．L-グルタミン酸存在下におけるスペルミンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合に対するポリアミンアンタゴニストの効果

ポリアミンアンタゴニストの薬理学的特性を明らかにするため，1 μM L-グルタミン酸存在下でスペルミンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合へのアンタゴニストの効果を検討した．スペルミンは L-グルタミン酸によって刺激された ^{3}H-TCP 結合をさらに増加させ，1 μM の濃度でその最大効果を示した．一方 1 μM 以上の濃度のスペルミンは著明に ^{3}H-TCP 結合を抑制した (図 5A)．

全てのアンタゴニストは程度の差はあるものの，1 μM L-グルタミン酸存在下のスペルミンの濃度依存曲線を，低親和性側にシフトさせた (図 5A-D)．またポリアミンアンタゴニストである 10μM DET と 10μM プトレッシンは，対照のスペルミン非存在下のレベルの88%と94%のレベルまでしか各々抑制しなかった (図 5A, 5B)．一方で 10μM アルカインと 10μM DA10 は11%と7%にまで各々抑制した (図 5C, 5D)．アルカインと DA10 によって抑制された対照のレベルは，アミノ酸やポリアミン等のアゴニスト非存在下の基底結合レベルと同等であり，両者の抑制は 1 μM L-グルタミン酸の ^{3}H-TCP 結合刺激効果に対する完全な拮抗作用によるものと考えられた．以上の結果は，1 μM L-グルタミン酸存在下でのスペルミンによる ^{3}H-TCP 結合刺激効果を抑制するアルカインと DA10 の効力が，明らかに DET とプトレッシンで得られたそれより強いものであることを示していた．

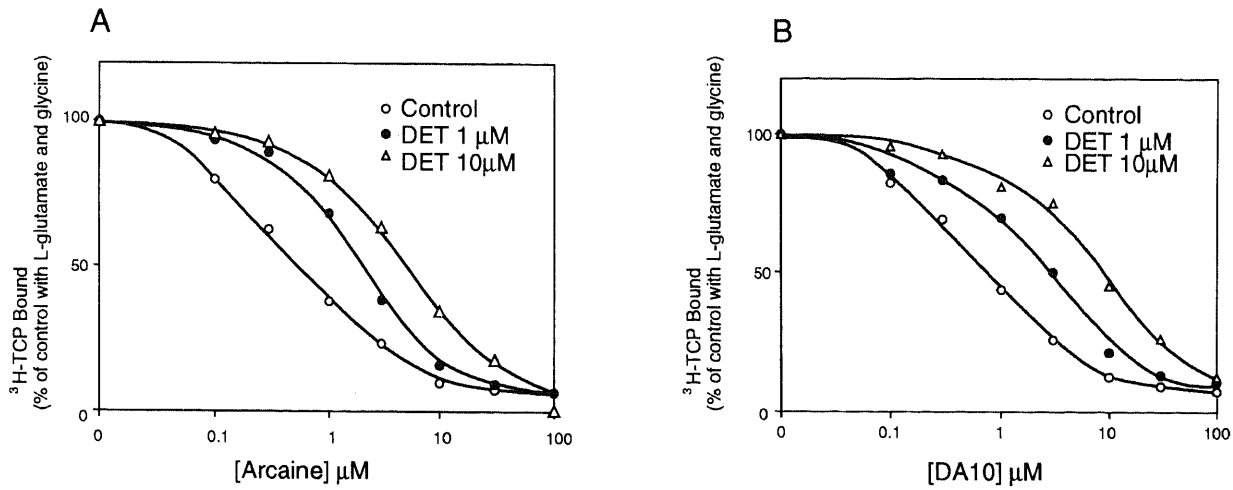


Fig. 4. The effect of DET on the inhibition of the L-glutamate and glycine-induced ^{3}H-TCP binding by arcaine and DA10. The effects of increasing concentrations of arcaine and DA10 on the ^{3}H-TCP binding saturated with 10 μM L-glutamate and glycine were determined in the absence (open circles) and the presence of 1 μM (closed circles) or 10 μM (open triangles) DET. Results are the average of triplicate determinations from a representative experiment that was repeated 3 times giving similar results.

考 察

I．高親和性 Mg^{2+} 結合部位とポリアミン結合部位の関係

NMDA 型受容体複合体の機能を調節する Mg^{2+} と，スペルミジン，スペルミンといったポリアミンの結合部位の特性について ^{3}H-TCP 結合実験にて検討した．

本実験において，スペルミンとスペルミジンは検討した濃度すべてにおいて，L-グルタミン酸によって刺激された ^{3}H-TCP 結合を相加的 (additive) に増加させていた．この結果は Ransom と Stec の ^{3}H-MK801 結合実験で得たスペルミジンの L-グルタミン酸への効果[10]に一致するものであり，ポリアミンが L-グルタミン酸結合部位とは異なる部位を介して ^{3}H-TCP 結合を刺激していることを示している．

一方，1 μM スペルミジンと 0.5μM スペルミンは Mg^{2+} の刺激した ^{3}H-TCP 結合を相加的に増加させていたが，より高い濃度である 3 μM および 10μM のスペルミジンと 1 μM および 3 μM のスペルミンは，相加的に増加させなかった．この結果は，上述したポリアミンと L-グルタミン酸との間で認められたような，違う結合部位に作用するアゴニストが示す相互作用とは若干異なるものである．その理由として図 1 と図 5 で示した，Mg^{2+} とポリアミンのもつ ^{3}H-TCP 結合に対しての 2 相性効果が関与していた可能性が考えられる．すなわち，Mg^{2+} 濃度の増加に従いイオンチャンネルも活性化され，そのため Mg^{2+} またはポリアミンの抑制部位がより優位となり，期待される ^{3}H-TCP 結合の増加を阻止してしまう可能性である．それゆえ，より高濃度のポリアミン存在下で相加的効果が認められなかったと推察できる．

このように，Mg^{2+} とポリアミンが ^{3}H-TCP 結合を刺激するのに各々特異的な結合部位を介するかどうかは，図 1 の結果からは明らかにならなかったが，両者が互いに影響を及ぼしあって NMDA 型受容体複合体の機能を調節することは確認できた．

高親和性 Mg^{2+} 結合部位とポリアミン結合部位の関係については，受容体結合実験による知見がいくつか報告されている．

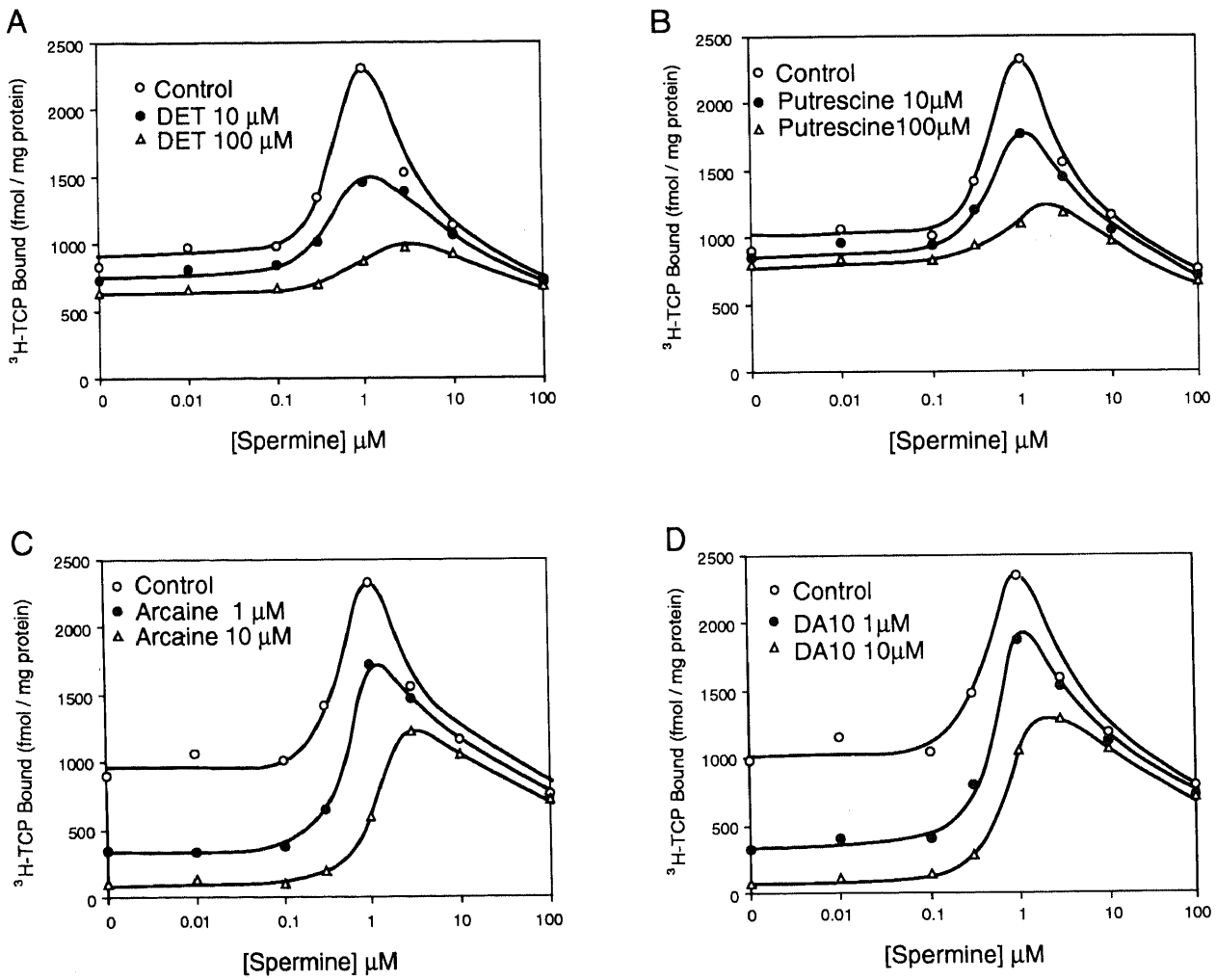


Fig. 5. Effects of polyamine antagonists on the spermine-induced ^{3}H-TCP binding in the presence of 1 μM L-glutamate. Concentration-response curves were determined for spermine in the absence (open circles) and the presence of 10 μM (closed circles) or 100μM (open triangles) DET (A); 1 μM (closed circles), 3 μM (open triangles) or 10 μM (closed triangles) arcaine (B); 1 μM (closed circles) or 10 μM (open triangles) DA10 (C); and 10 μM (closed circles) or 100 μM (open triangles) putrescine (D). All assays were carried out in the presence of 1 μM L-glutamate. Results are the average of triplicate determinations from a representative experiment that was repeated 3 times giving similar results.

Sacaan と Johnon[22] はポリアミンアンタゴニストとされているアルカインが，スペルミジンと Mg^{2+} の両方の ^{3}H-TCP 結合刺激効果を競合的に抑制することを報告している．この結果はスペルミジンと Mg^{2+} が同じ機序で ^{3}H-TCP 結合を刺激することを示している．しかし，アルカインがポリアミンアンタゴニストであることに対する反証も示されてきており，この結論も再検討の余地が残されている．アルカインの薬理学的特性については後に考察する．

Wong らは[23] スペルミジンと Mg^{2+} の ^{3}H-MK801 結合に対する効果が相加的であると報告している．kinetics の実験からは，^{3}H-MK801 結合または ^{3}H-TCP 結合において低濃度の Mg^{2+} が結合速度と解離速度の両方を増加させるという結果が報告されている[13)27)]．また，一方でスペルミジンは ^{3}H-TCP 結合速度を増加させ逆に解離速度を減少させるという結果も得られている[28]．Wong らの報告とここに示した kinetics の違いから，スペルミジンの効果と Mg^{2+} のそれとは区別できるものであると考えられる．

本研究では，L-グルタミン酸やグリシン存在下での Mg^{2+} とスペルミンの ^{3}H-TCP 結合への効果を検討し，両者の差異を示唆することができた．Ransom と Stec[10] の報告したスペルミジンによる ^{3}H-MK801 結合増加に対しての EC_{50} 値は，10μM L-グルタミン酸存在下で 3.9μM であり，10μM グリシン存在下で 6.2μM であった．本実験のスペルミンによる ^{3}H-TCP 結合増加に対しての EC_{50} 値は，10μM L-グルタミン酸存在下で 0.48μM であり，10μM グリシン存在下で 0.68μM であった．Ransom と Stec[10] の報告した EC_{50} 値に基づいてスペルミジンによる ^{3}H-MK801 結合増加に対する EC_{50} 値の比を算出したところ，対照：+10μM L-グルタミン酸：+10μM グリシン＝1：0.20：0.32であり我々の結果とほぼ一致するものであった．これらは，L-グルタミン酸とグリシンが，^{3}H-TCP 結合を刺激するポリアミンの親和性を同程度に高めていることを示している．一方で，Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合増加に対しての EC_{50} 値からその比を算出したところ，対照：+10μM L-グルタミン酸：+10μM グリシン＝1：0.17：0.76であった．このように Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激に対して，アミノ酸による修飾 (modulation) の程度が違うことは，高親和性 Mg^{2+} 結合部位が L-グルタミン酸とグリシンにより異なった様式で修飾されていることを示している．さらには，両アミノ酸による修飾が同程度であったポリアミン結合部位と異なっていることから，高親和性 Mg^{2+} 結合部位はポリアミン結合部位とは異なった部位である可能性も示唆している．

上述した仮説をさらに支持する為，Mg^{2+} とスペルミンによる各々の^{3}H-TCP 結合刺激効果に対してのアルカイン，DA10，DET，プトレッシンといったポリアミンアンタゴニストの効果を検討した．全てのポリアミンアンタゴニストは，100μM Mg^{2+} と 1μM スペルミンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合を濃度依存性に完全に抑制し，しかもアンタゴニストによる抑制効力の順序は，両刺激の場合では同一であった．これらの結果は，Mg^{2+} とスペルミンの ^{3}H-TCP 結合刺激効果が類似した機序で発現している可能性を示唆するものであった．

ポリアミンアンタゴニストである DET とプトレッシンを使い Mg^{2+} とスペルミンの ^{3}H-TCP 結合刺激効果の抑制様式をさらに検討したところ，両者は両アゴニストの効果に対し競合的抑制を示していた．DET はポリアミン結合部位への選択的かつ競合的アンタゴニストとして作用することから[11]，これらの結果は Mg^{2+} の ^{3}H-TCP 結合刺激性効果がポリアミン結合部位と同一部位を通じて発現しているか，または密接な関連があることを示唆している．これは，上述した仮説と相反するものである．この矛盾についてはのちに考察する．

Williams ら[11] はポリアミンの ^{3}H-MK801 結合の刺激効果に，プトレッシンが選択的に拮抗する作用を報告している．本実験においても，プトレッシンがポリアミン結合部位に競合的に作用する結果が得られている．ところが，Sacaan と Johnson[28] はスペルミジンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合に対してプトレッシンが非競合的に抑制する報告をしている．また，Schoemaker ら[29] のスペルミンやスペルミジンと同じ部位を認識するとされている ^{3}H-ifenprodil の結合実験において，プトレッシンが ^{3}H-ifenprodil の結合部位に全く親和性をもたないという報告も認められる．上述した過去の報告と本実験結果の間の矛盾は，結合実験に用いられた膜標品の濃度の違いに起因するものと推測される．

本研究の実験では，膜標品中に残存している ^{3}H-TCP 結合を修飾する内因性物質の影響を極力抑えるため濃度の薄い膜標品を使用しており，蛋白 10μg 相当を最終的に 200μl でインキュベーションを行っている (すなわち蛋白 50μg 相当/ml)．また Williams らも同様に蛋白 75μg 相当/ml と共に薄い膜標品を使用している．一方で，Sacaan と Johnson は蛋白 200μg 相当/ml とより濃い膜標品濃度で実験しており，内因性物質がプトレッシンの ^{3}H-TCP 結合への効果をアロステリックに修飾していたことが示唆される．Schoemaker らの膜標品濃度は記載がなかった．このように，適正なプトレッシンの効果の検討には内因性物質を十分取り除く必要がある．図5において，1μM L-グルタミン酸の刺激した ^{3}H-TCP 結合に対して DET とプトレッシンが若干の抑制効果を示したのは，残存する内因性のポリアミンに対する抑制効果のためと考えられた．

まとめると，Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激に対してアミノ酸による修飾の程度が違うことは，高親和性 Mg^{2+} 結合部位が L-グルタミン酸とグリシンから異なった様式で修飾されていることを示していた．さらには，両アミノ酸からの修飾が同程度であったポリアミン結合部位と異なっていることから高親和性 Mg^{2+} 結合部位はポリアミン結合部位とは異なった部位である可能性も示唆していた．一方で，DET とプトレッシンは Mg^{2+} とスペルミンによる ^{3}H-TCP 結合の刺激効果に対し競合的抑制を示していた．これらの結果は Mg^{2+} の ^{3}H-TCP 結合刺激性効果がポリアミン結合部位と同一部位を通じて発現しているか，または密接な関連があることを示唆していた．

これらの相反する現象を説明するには2つの解釈が考えられる．一つは高親和性 Mg^{2+} 結合部位とポリアミン結合部位は実際は異なる部位ではあるが，ポリアミンアンタゴニストに対しての薬理学的特性が類似しているという解釈である．もう一つは，Mg^{2+} とポリアミンは同一部位を介して ^{3}H-TCP 結合を刺激するが，Mg^{2+} によるポリアミン結合部位の刺激により，L-グルタミン酸とグリシンによって異なった修飾が観察されるような形式で conformation が変化するという解釈である．後者の解釈は考えにくいものがあるが，本実験からその可能性を否定することは困難である．

今後，高親和性 Mg^{2+} 結合部位とポリアミン結合部位の各々に対し選択性の高い新たなアンタゴニストを使った実験で，両

部位の違いが明らかになるであろう．

Ⅱ．インバースアゴニストとしてのアルカイン

アルカインは，スペルミジンが刺激した ^{3}H-MK801 結合や ^{3}H-TCP 結合を濃度依存性に抑制することから，ポリアミン結合部位への競合的アンタゴニストとして理解されてきた[22)30)]．しかしアルカインは，スペルミンやスペルミジンといったポリアミンの非存在下においてさえも，^{3}H-MK801 や ^{3}H-TCP の基底結合を抑制していることが最近確認されるようになってきた．この現象に関しては，よく洗浄してもなお膜標品に残存する内因性ポリアミンに対する拮抗作用とする考え方[22)]がある一方で，アルカインがポリアミン結合部位へのインバースアゴニスト (inverse-agonist) とする可能性も指摘されている[31)]．現段階ではアルカインの薬理学的特性はまだ検討する余地が残されている．

そこでアルカインの薬理学的作用を，ポリアミンの選択的かつ競合的アンタゴニストとされる DET[26)]と，ポリアミン結合部位へのインバースアゴニストとされる DA10 の作用と比較して検討した．尚，インバースアゴニストとは，対応するアゴニストと同一部位に作用し，しかもアゴニストとは逆の効果を生み出す物質を意味する[26)]．

本実験において，アルカインと DA10 は 1 μM の L-グルタミン酸が刺激した ^{3}H-TCP 結合を濃度依存性に完全に抑制した．対照的に DET とプトレッシンは完全な抑制は認められなかった．電気生理学的実験においても同様な結果が認められており，スペルミン非存在下においてアルカインと DA10 が NMDA とグリシンによるカレント (current) を DET やプトレッシンより著明に強く抑制した報告[32)]がある．これらの結果はアルカインの作用が DET より，むしろ DA10 と同じ作用であることを示唆している．さらに，アルカインがポリアミン非存在下で 1 μM L-グルタミン酸によって刺激された ^{3}H-TCP 結合を完全に抑制したことは，インバースアゴニストである可能性を支持する所見である．

アルカインと DA10 は L-グルタミン酸とグリシンによって最大限に刺激された ^{3}H-TCP 結合を完全に抑制し，その両者の抑制効果は DET によって同じ形式で減弱された．これらの所見はアルカインと DA10 の抑制効果が DET の作用部位と同一部位，すなわちポリアミン結合部位を介して発現していることを示唆している．加えて両者は L-グルタミン酸とスペルミンの両刺激効果に対し強い拮抗作用を示し，しかも DET やプトレッシンの抑制効果と比して著しく強いものであった (図 5)．このようにこれらの結果は，アルカインが競合的にポリアミンアンタゴニストの DET より，むしろポリアミン結合部位へのインバースアゴニストである DA10 と同じ作用をもっていることを支持している．さらに，Sacaan と Johnson の実験と本実験で観察した Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激効果をアルカインが抑制したことは，インバースアゴニストとしての抑制作用によるものと推察され，この結果から Mg^{2+} とポリアミンの結合部位の関係を論じることは適当ではないと考えられる．

結　　論

NMDA 型受容体イオンチャンネル複合体の機能を調節する高親和性 Mg^{2+} 結合部位およびポリアミン結合部位の特性を調べるため，Mg^{2+}，ポリアミン，ポリアミンアンタゴニストおよびアミノ酸との相互作用を ^{3}H-TCP 結合実験にて検討し，以下の知見を得た．

1．低濃度のポリアミンは Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激を相加的に増加させていたが，より高濃度のポリアミンでは相加的な ^{3}H-TCP 結合の増加は認められなかった．一方，Mg^{2+} による ^{3}H-TCP 結合刺激の場合と異なり，今回検討した濃度のポリアミンは L-グルタミン酸による ^{3}H-TCP 結合の刺激を相加的に増加させていた．これは，ポリアミンが L-グルタミン酸結合部位とは異なる部位を介して NMDA 型受容体複合体を調節していることを示唆している．

2．10μM L-グルタミン酸と 10μM グリシンは，^{3}H-TCP 結合を刺激するスペルミンの親和性を同程度に増加させる一方で，L-グルタミン酸は ^{3}H-TCP 結合を刺激する Mg^{2+} の親和性をグリシンより著明に強く増加させていた．これは，高親和性 Mg^{2+} 結合部位がポリアミン結合部位とは異なる部位であることを示唆している．また，競合的ポリアミンアンタゴニストである DET とプトレッシンは，Mg^{2+} とスペルミンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合をどちらも競合的に抑制した．これは，Mg^{2+} がポリアミン結合部位を介して ^{3}H-TCP 結合を刺激していることを示唆している．これらの相反する結果は，Mg^{2+} とポリアミンが NMDA 型受容体複合体の機能を調節するのに，同一機序を介していない可能性を示すものである．

3．アルカインと DA10 は，1 μM L-グルタミン酸，100μM Mg^{2+} と 1 μM スペルミンによって刺激された ^{3}H-TCP 結合を濃度依存性に抑制した．それら抑制の効力は，明らかに DET より高いものであった．10μM DET は，L-グルタミン酸とグリシンによる ^{3}H-TCP 結合の刺激を抑制するアルカインと DA10 の効果を減弱させていた．これらの結果は，アルカインが DA10 と同じ作用を持つポリアミン結合部位へのインバースアゴニストであることを示していた．

以上の結果から，NMDA 型受容体イオンチャンネル複合体の機能は，アミノ酸のみならず Mg^{2+} とポリアミンによっても調節されていることが明らかになった．しかもそれらの調節部位 (結合部位) の機能は各々異なり，互いに影響を及ぼしあっていることも示していた．このように本研究の結果は，NMDA 型受容体が病態に関わる多くの疾病や異常に，中枢神経内に存在する Mg^{2+} とポリアミンもその発症や増悪に関与している可能性を示唆していた．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜りました金沢大学医学部公衆衛生学講座岡田晃教授に謝意を表します．さらに，直接の御指導を賜りました東京都精神医学総合研究所精神薬理部門諸治隆嗣参事研究員，山本秀子研究員，横浜市立大学大学院総合理学研究科山本敏文助教授，筑波大学医学部附属病院精神神経科堀孝文先生に深く感謝いたします．

文　　献

1) **Wong, E. H & Kemp, J. A.**: Sites for antagonism on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **31**, 401-425 (1991).

2) **Williams, K., Romano, C., Dicher, M. A. & Molinoff, P. B.**: Modulation of the NMDA receptor by polyamines. Life Sci., **48**, 469-498 (1991).

3) **Olney, J. W.**: Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. Biol. Psychiatry, **26**, 505-525 (1989).

4) **Foster, A. C. & Fagg, G. E.**: Taking apart NMDA

receptors. Nature, **329**, 395-396 (1987).

5) **Reynolds, I. J., Murphy, S. N. & Miller, R. J.**: [^{3}H] labeled MK-801 binding to the excitatory amino acid receptor complex from brain is enhanced by glycine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 7744-7748 (1987).

6) **Foster, A. C. & Wong, E. H. F.**: The novel anticonvulsant MK-801 binds to the activated state for the NMDA receptor in rat brain. Br. J. Pharmacol., **91**, 403-409 (1987).

7) **Wong, E. H. F., Knight, A. R. & Ransom, R.**: Glycine modulates [^{3}H] MK-801 binding to the NMDA receptor in rat brain. Eur. J. Pharmacol., **142**, 487-488 (1987).

8) **Huettner, J. E. & Bean, B. P.**: Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: Selective binding to open channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 1307-1311 (1988).

9) **Wong, E. H. F., Knight, A. R. & Woodruff, G. N.**: [^{3}H] MK-801 labels a site on the NMDA receptor channel complex in rat brain membranes. J. Neurochem., **50**, 274-281 (1988).

10) **Ransom, W. R. & Stec, N. L.**: Cooperative modulation of [^{3}H] MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. J. Neurochem., **51**, 830-836 (1988).

11) **Williams, K., Carmelo, R. & Molinoff, B.**: Effects of polyamines on the binding of [^{3}H] MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: Pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. Mol. Pharmacol., **36**, 575-581 (1989).

12) **Vignon, J., Vincent, J. P., Bidard, Kamenka, J. M., Geneste, P., Monier, S. & Lazdunski, M.**: Biochemical properties of the brain Phencyclidine receptor. Eur. J. Pharmacol., **81**, 531-542 (1982).

13) **Hori, T., Yamamoto, T., Hatta, K. & Moroji, T.**: Modulation of Mg^{2+}-dependent [^{3}H] TCP binding by L-glutamate, glycine, and guanine nucleotide in rat cerebral cortex. Synapse, 8, 13-21 (1991).

14) **Johnson, K. M., Snell, L. D. & Morter, R. S.**: N-methyl-D-aspartate enhanced [^{3}H] TCP binding to rat cortical membranes: effects of divalent cations and glycine. *In* E. F. Domino & J. M. Kamenka (eds.), Sigma and PCP-like Compounds as Molecular Probes in Biology, 1st ed., p259-268, NPP Books, Ann, Michigan, 1988.

15) **Mayer, M. L., Westbook, G. L. & Guthrie, P. B.**: Voltage dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons. Nature, **306**, 261-263 (1984).

16) **Mayer, M. L. & Westbook, G. L.**: The potentiation and block of N-methyl-D-aspartate acid receptor channel by divalent cations in mouse cultured central neurons. J. Physiol., **394**, 501-527 (1987).

17) **Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. & Prochiantz, A.**: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. Nature, **307**, 462-465 (1984).

18) **Mcdermott, A. B., Mayer, M. L., Westbook, G. L., Smith, S. J. & Bakker, J. L.**: NMDA-receptor activation increases cytoplastic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. Nature, **321**, 519-522 (1986).

19) **Ascher, O. P. & Nowak, L.**: The role of divalent catios in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons in culture. J. Physiol., **399**, 247-266 (1988).

20) **Hood, C. R., Thomas, J. W., Compton, R. P. & Monahan, J. B.**: Guanine nucleotide modulation of [^{3}H] TCP binding for the NMDA receptor complex. Eur. J. Pharmacol., **188**, 43-49 (1990).

21) **Hori, T., Yamamoto, T., Hatta, K. & Moroji, T.**: Biphasic effects of magnesium on the [^{3}H] N-(1-(2-Thienyl) cyclohexyl)3, 4-piperidine binding in the rat cerebral cortex. Neurosci. Lett., **119**, 9-11 (1990).

22) **Sacaan, A. I. & Johnson, K. M.**: Competitive inhibition of magnesium-induced [^{3}H] N-(1-[Thienyl] cyclohexyl) piperidine binding by arcaine: Evidence for a shared spermidine-magnesium binding site. Mol. Phalmacol., **38**, 705-710 (1990).

23) **Wong, M. L., Frusciante, D. C., Javitt, D. C. & Zukin, S. R.**: Polyamine stimulation of [^{3}H] MK-801 binding: implications for NMDA receptor functioning. Soc. Neurosci. Abstr., **15**, 201 (1989).

24) **Loo, P. S., Baunwalder, A. F., Lehmann, J., Williams, M. & Sills, M. A.**: Interaction of L-glutamate and magnesium with phencyclidine recognition site in rat brain: Evidence for multiple affinity states of the PCP/NMDA receptor complex. Mol. Pharmacol., **32**, 820-830 (1987).

25) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 266-275 (1951).

26) **Williams, K., Dawson, V. L., Romano, C., Dichter, M. C. & Molinoff, P. B.**: Characterization of polyamines having agonist, antagonist, and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. Neuron, **5**, 199-208 (1990).

27) **Reynolds, I. J. & Miller, R. J.**: Multiple sites for the regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor. Mol. Pharmacol., **33**, 581-584 (1988).

28) **Sacaan, A. I. & Johnson, K. M.**: Characterization of the stimulatory and inhibitory effects of polyamine on [^{3}H] N-(1-[Thienyl] cyclohexyl) piperidine binding to the N-methyl-D-aspartate receptor ionophone complex. Mol. Pharmacol., **37**, 572-577 (1990).

29) **Schoemaker, H., Allen, J. & Langer, Z.**: Binding of [^{3}H] ifenprodil, a novel NMDA antagonist, to a polyamine-selective site in the rat cortical cortex. Eur. J. Pharmacol., **176**, 249-250 (1990).

30) **Reynolds, I. J.**: Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor. Eur. J. Pharmacol., **177**, 215-216 (1990).

31) **Reynolds, I. J.**: Arcaine uncovers dual interactions of polyamine with the N-methyl-D-aspartate receptor. J.

Pharmacol. Exp. Ther., **255**, 1001-1007 (1990).

32) **Maciever, C. R., Bednar, D. L. & Karbon, W.:** Opposite effects of spermine and arcaine on responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in Xenopus oocytes. Neurosci. Lett., **132**, 146-150 (1991).

Characterization of High Affinity Mg^{2+} and Polyamine Recognition Sites on the NMDA Receptor Ion Channel Complex Hirofumi Nagase, Department of Public Health, School of Medicine, Kanazawa University,Kanazawa 920－ J. Juzen Med Soc., **102**, 28－38 (1993)

Key words NMDA receptor ion channel complex, high affinity Mg^{2+} site, polyamine recognition site, polyamine antagonists, inverse agonist

Abstract

In recent years, a specific subtype of excitatory amino acid receptors, the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, has become a primary focus of attention because of evidence suggesting that it may be involved in a wide range of both neurophysiological and pathological processes. The NMDA receptor is thought to be a receptor ion channel complex containing a number of distinct recognition sites for glutamate (and NMDA), glycine, (+)-5-methyl-10, 11-dihydro-5H-dibenzo [a, d]-cyclohepten-5, 10-imine (MK-801) (and N-(1-[2-thienyl] cyclohexyl)-3, 4-piperidine (TCP)), Mg^{2+}, polyamines including spermidine and spermine. This study was designed to characterize the high affinity Mg^{2+} and the polyamine recognition sites regulating the NMDA receptor ion channel complex. Using ^{3}H-TCP binding assay, the interactions of Mg^{2+}, polyamines, their antagonists and amino acids were investigated. Spermidine and spermine at 1 μM and 0.5 μM, respectively, but not at higher concentrations, further enhanced the Mg^{2+}-stimulated ^{3}H-TCP binding in an additive manner. Unlike Mg^{2+}-stimulated ^{3}H-TCP binding, both polyamines at concentrations examined produced additive enhancement of the L-glutamate-stimulated ^{3}H-TCP binding, respectively, indicating that polyamine and L-glutamate stimulate ^{3}H-TCP binding by acting through distinct sites on the NMDA receptor ion channel complex. On the other hand, both L-glutamate (10 μM) and glycine (10 μM) increased the potency of spermine in enhancing ^{3}H-TCP binding to a similar extent, while L-glutamate increased the potency of the Mg^{2+} enhancement much more than glycine. Polyamine antagonists, diethylenetriamine (DET) and putrescine, inhibited the Mg^{2+}-and spermine-induced ^{3}H-TCP binding in a competitive manner. These conflicting observations indicate that Mg^{2+} and spermine are unlikely to share the same mechanism for enhancing ^{3}H-TCP binding. Furthermore, these suggest the possibility that Mg^{2+} and polyamine modulate the NMDA receptor ion channel complex acting at distinct recognition sites, that is, a high affinity Mg^{2+} and a polyamine recognition sites. Additionally, arcaine and 1, 10-diaminodecane (DA10) inhibited ^{3}H-TCP binding induced by 1 μM L-glutamate, 100 μM Mg^{2+} and 1 μM spermine in concentration-dependent manner. Their potencies were much greater than that of DET. DET (10 μM) attenuated the inhibitory effects of DA10 and arcaine on the L-glutamate and glycine-induced ^{3}H-TCP binding. These indicate that arcaine functions as an inverse-agonist at the polyamine recognition site as does DA10.