

Studies on the High Affinity Mg²⁺ Binding Site on the NMDA/PCP 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/2297/8225

NMDA/PCP レセプターイオンチャンネル複合体における 高親和性 Mg^{2+} 結合部位に関する研究

金沢大学医学部公衆衛生学講座 (主任: 岡田 晃教授)

八 田 耕 太 郎

(平成2年10月24日受付)

最近, 非常によく洗浄したラット大脳皮質膜標品を用いたレセプター結合実験において, N-methyl-D-aspartate (NMDA)/phencyclidine (PCP) レセプターイオンチャンネル複合体に低濃度の Mg^{2+} に対して高い親和性を有し, [3H] N-11-[2-thienyl]cyclohexyl)-3, 4-piperidine ([3H]TCP) 結合を促進する部位 (高親和性 Mg^{2+} 結合部位) が存在することが提唱されている. また, この高親和性 Mg^{2+} 結合部位はグルタミン酸結合部位 (あるいは NMDA レセプター) やグリシン結合部位との間に何らかの機能的な相関を有することが示唆されている. そこで本研究では, 非常によく洗浄したラット大脳皮質膜標品に対する [3H]TCP 結合を指標として, NMDA/PCP レセプターイオンチャンネル複合体における高親和性 Mg^{2+} 結合部位の性質を競合的NMDA アンタゴニストおよび選択的グリシンアンタゴニストを用いて調べた. 競合的NMDA アンタゴニストである 3-(($\pm$)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP), D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) および 2-amino-7-phosphonoheptanoate (D, L-AP7) の $1 \mu M$ L-グルタミン酸, $1 \mu M$ グリシンおよび $300 \mu M$ Mg^{2+} による [3H]TCP 結合活性化に対する影響を検討したところ, いずれの NMDA アンタゴニストもそれぞれ濃度依存性に [3H]TCP 結合活性化を完全に抑制した. しかも, NMDA アンタゴニストのいずれも低濃度の Mg^{2+} による [3H]TCP 結合の活性化を最も強く抑制し, その順序は, $Mg^{2+} > \text{グリシン} > \text{L-グルタミン酸}$ であった. $1 \mu M$ L-グルタミン酸 $1 \mu M$ グリシンおよび $300 \mu M$ Mg^{2+} によって活性化される [3H]TCP 結合に対する選択的グリシンアンタゴニストである 6, 7-dichloroquinoxaline-2, 3-dione (DCQX), 7-chlorokynurenic acid (7-ClKYNA) および 3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone (HA-966) の作用は以下の通りであった. DCQX は L-グルタミン酸および Mg^{2+} による [3H]TCP 結合活性化に対する抑制に比べてグリシンによって活性化される [3H]TCP 結合を最も強く抑制した. HA-966 はグリシンおよび Mg^{2+} によって活性化される [3H]TCP 結合を同程度に抑制したが, L-グルタミン酸による [3H]TCP 結合の活性化に対して抑制を示さなかった. 7-ClKYNA は L-グルタミン酸, グリシンおよび Mg^{2+} によって活性化される [3H]TCP 結合を同程度に抑制した. 以上の結果は, NMDA/PCP レセプターイオンチャンネル複合体に高親和性 Mg^{2+} 結合部位が存在するという推論を強く支持する知見であり, また同部位が競合的 NMDA アンタゴニスト結合部位と機能的にきわめて密接な相互調節作用を有することを示唆している. さらに高親和性 Mg^{2+} 結合部位がグリシン結合部位との間にも緊密な相互調節作用を有することが推測される.

Key words NMDA/PCP receptor ion channel complex, [3H] TCP binding, Mg^{2+} binding site, NMDA antagonist, glycine antagonist

Abbreviations: 7-ClKYNA, 7-chlorokynurenic acid; CPP, 3-(($\pm$)-2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid; D-AP5, D-2-amino-5-phosphonopentanoate; DCQX, 6,7-dichloroquinoxaline-2,3-dione; D,L-AP7, 2-amino-7-phosphonoheptanoate; HA-966, 3-

フェンサイクリジン (phencyclidine, PCP) は、呼吸器系や循環器系を抑制しない優れた麻酔薬として導入された。ところが、臨床に導入されて間もなく興奮、奇妙な行動、幻覚などを引き起こすことが明らかとなり、麻酔薬として臨床で使用されることはなくなった。臨床での使用が中止されるのと相前後して、PCP はアメリカ合衆国で“angel dust”と呼ばれて乱用されるようになり、最近では第2位の乱用薬物となっている¹⁰⁾。一方、長期間の乱用は精神分裂病様の多彩な臨床像を呈する精神障害を惹起すること³⁴⁾や精神分裂病を増悪させることが明らかとなり⁹⁾、以来、精神分裂病の新たなモデルとして注目されるようになってきている¹⁶⁾。そこで、PCP の中枢薬理に関する研究が多方面から行われているが、未だ一致した見解は見いだされていない。しかし、最近、PCP に対するレセプターが脳内に広く分布して存在することが見いだされ⁷⁶⁾、PCP の中枢作用はこのレセプターを介して発現するのではないかと推測され、PCP レセプターの特性を薬理的、分子生物学的に解明しようとする試みが行われている²⁹⁾。

現在、PCP レセプターには、①N-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターと共役するタイプと② σ レセプターと共役するタイプの2種類が想定されている¹⁰⁾。NMDA レセプターと共役する PCP レセプターは、NMDA レセプターと複合体を形成しているイオンチャネル内に存在すると考えられており¹¹⁾、全体として NMDA/PCP レセプターイオンチャネル複合体 (NMDA/PCP receptor ion channel complex) と呼ばれている。この複合体は、イオンチャネル内に存在するマグネシウムイオン (Mg^{2+}) 結合部位¹²⁾¹³⁾、NMDA (あるいはグルタミン酸) 結合部位¹¹⁾、グリシン結合部位^{14)~16)}、亜鉛イオン (Zn^{2+}) 結合部位^{17)~19)}、ポリアミン結合部位²⁰⁾²¹⁾を有し、それぞれの間で相互調節作用があると考えられている^{12)13)19)22)~28)}。

ところで、イオンチャネル内に存在する Mg^{2+} 結合部位は電位依存性 (voltage-dependent manner) にチャネルを阻害し^{29)~32)}、 3H で標識した PCP のアナログ [3H]N-(1-[2-thienyl] cyclohexyl)-3,4-piperidine ([3H]TCP) の PCP レセプターへの結合を阻害すると考えられている³³⁾³⁴⁾。ごく最近、非常に良く洗浄したラット大脳皮質ホモジネートを用いたレセプター結合実験において、300 μ M以下の低濃度の Mg^{2+} を認識して [3H]TCP 結合を活性化する部位 (高親和性

Mg^{2+} 結合部位)、即ち Mg^{2+} に対する高親和性結合部位の存在が提唱されている³⁵⁾。この高親和性 Mg^{2+} 結合部位は、[3H]TCP 結合を活性化するだけでなく、反応初期速度を上昇させること、[3H]TCP 結合活性化はグルタミン酸やグリシンによる [3H]TCP 結合活性化に対して相加的であること、さらに Mg^{2+} による [3H]TCP 結合の親和性はグルタミン酸やグリシンによってさらに高親和性側に移行することなどが明らかにされている³⁵⁾。このような知見は、高親和性 Mg^{2+} 結合部位とグルタミン酸結合部位 (あるいは NMDA レセプター)³⁶⁾やグリシン結合部位³⁷⁾との間に何らかの機能的な相関があることを示唆している。新たに見いだされたこの高親和性 Mg^{2+} 結合部位の性質を明らかにすることは NMDA/PCP レセプターイオンチャネル複合体の中枢神経系における機能的役割を理解する上できわめて重要であるといえるが、その詳細は未だ十分に検討されていない。そこで、上述したグルタミン酸結合部位 (あるいは NMDA レセプター) やグリシン結合部位との間に想定されている機能的相関を考える上で、高親和性 Mg^{2+} 結合部位に対する NMDA アンタゴニストやグリシンアンタゴニストの作用を検討することは高親和性 Mg^{2+} 結合部位の性質を解明する一つの有力な手段になると考えられる。

そこで今回、ラット大脳皮質ホモジネートに対する [3H]TCP 結合を指標として、競合的 NMDA アンタゴニスト³⁸⁾である 3-(($\pm$)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP)^{39)~41)}、D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5)⁴²⁾⁴³⁾、2-amino-7-phosphonoheptanoate (D, L-AP7)⁴⁴⁾、グリシンアンタゴニストである 6,7-dichloroquinoxaline-2,3-dione (DCQX)⁴⁵⁾⁴⁶⁾、7-chlorokynurenic acid (7-ClKY-NA)⁴⁷⁾⁴⁸⁾、3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone (HA-966)⁴⁹⁾⁵⁰⁾を用いて NMDA/PCP レセプターイオンチャネル複合体における高親和性 Mg^{2+} 結合部位の性質を詳細に検討したところ非常に興味ある結果を得たのでここに報告し、若干の考察を加える。

材料および方法

1. 薬品

本研究において使用した薬品は次の通りである。

L-グルタミン酸、グリシン (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.); CPP, D-AP5, L-AP7, DCQX, 7-ClKYNA, HA-966

amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone; [3H]TCP, [3H] N-(1-[2-thienyl]cyclohexyl)-3,4-piperidine; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PCP, phencyclidine

(Tocris Neuramin Ltd., Buckhurst Hill, U.K.); [^3H]TCP (47.8Ci/mmol) (New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A.); PCP は塩野義製薬株式会社 (大阪) より提供を受けた。

II. 実験方法

1. 膜標品の調製

Wistar 系雄性ラット (150–250g) を断頭し、直ちに脳を取り出し、大脳皮質を 0.32M sucrose でホモジネートして、900×g, 10分間、4℃で遠心した。上清を再びホモジネートした後、20,000×g, 20分間、4℃で遠心して沈澱部分 (P_2 分画) を得た。 P_2 分画中に存在する内因性アミノ酸などを可能な限り除去する目的で以下に述べる操作を行った。まず、 P_2 分画に20倍量の 50mM Tris-HCl pH 7.6/10mM EDTA 緩衝液 (緩衝液A) でホモジネートし、20,000×g, 20分間、4℃で遠心・洗浄を行った。得られた沈澱を20倍量の緩衝液Aでホモジネートした後、37℃, 10分間のブレイン

キューベーションを行い、上述した条件で2回目の洗浄・遠心した。ここで得られた沈澱を20倍量の緩衝液Aでホモジネートし、ドライアイスを用いて凍結、融解 (freezing-thawing) を行い、3回目の洗浄・遠心した。最後に得られた沈澱は、5mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) でホモジネートし、超低温庫 (−80℃) 内に保存した。

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 20,000×g, 20分間、4℃で2回目洗浄・遠心し、結合実験に供した。

2. [^3H]TCP 結合実験

膜標品 (蛋白量 10 μg) は、5nM [^3H]TCP および必要に応じた濃度の賦活剤あるいは阻害剤と共に 5mM Tris-HEPES 緩衝液 (pH 7.6) で23℃にて1時間インキューベーションした。インキューベーションはポリプロピレンチューブ (Falcon, NJ, U.S.A.) の中で全体量

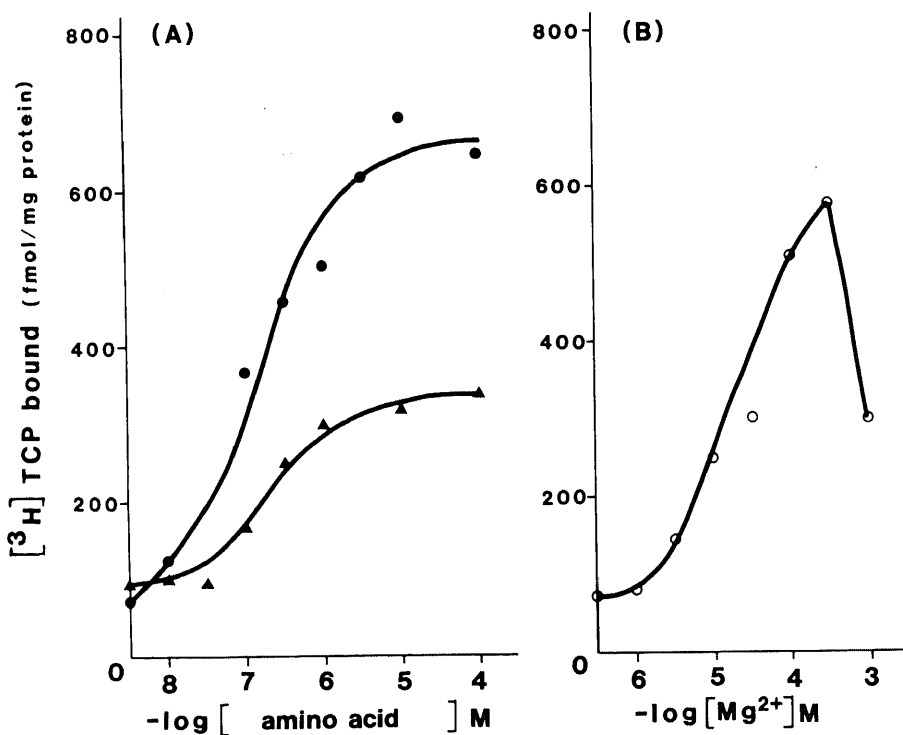


Fig. 1. Effects of L-glutamate, glycine and Mg^{2+} on [^3H]TCP binding to rat cortical membranes. (A): Effects of L-glutamate and glycine. Frozen-thawed and extensively washed rat cortical membranes were incubated with 5 nM [^3H]TCP and increasing concentrations of L-glutamate (●) or glycine (▲) (0–100 μM). (B): Effects of Mg^{2+} . Frozen-thawed and extensively washed rat cortical membranes were incubated with 5 nM [^3H]TCP and various concentrations of Mg^{2+} (0–1mM). The results were one representative experiment from at least three separate experiments each run in triplicate.

200 μ l として行った。反応は、インキュベーション 1 時間後、セルハーベスター (Model M-24R, Brandel, Gaithersburg, MD, U.S.A.) を用いて Whatman GF/C フィルター (Brandel) 上に吸引濾過することにより急速に終了させた。その後、Whatman GF/C フィルターは、未結合の [3 H]TCP を除去するために氷冷した 5mM Tris-HEPES 緩衝液 4ml で 3 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に予め 0.05% polyethylenimine 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 Aquasol (NEN, 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 LS 9800) (Beckman) を用いて測定した。

特異的結合は 30 μ M PCP 存在下および非存在下の差として求めた。

4. 蛋白量の測定

使用した膜標品の蛋白量は、Lowry ら⁵⁰⁾の方法に従って測定した。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

実験はトリプリケイトで行った。[3 H]TCP 結合に対する NMDA アンタゴニストおよびグリシンアンタゴニストの 50% 阻害を示す濃度 (IC_{50}) は Hill プロットより求めた。各実験を最低 3 回繰り返して IC_{50} の平均値を算出した。平均値の比較には Student の t-検定 (両側検定) を用いた。P 値が 0.05 以下を統計学的に有意差ありとした。

成 績

I. 大脳皮質膜標品の特異的 [3 H] TCP 結合に対する L-グルタミン酸、グリシン、 Mg^{2+} の影響

L-グルタミン酸およびグリシンは濃度依存性に [3 H]TCP 結合を高め、10 μ M L-グルタミン酸および 10 μ M グリシン存在下での [3 H]TCP 結合はそれぞれ対照の約 8 倍および約 3 倍まで増加した (図 1A)。一方、 Mg^{2+} は、3~300 μ M の濃度範囲では L-グルタミン酸やグリシンと同様に [3 H]TCP 結合を濃度依存性に増加させたが、1mM 以上の濃度では反対に [3 H]-TCP 結合を抑制した (図 1B)。L-グルタミン酸あるいはグリシンは Mg^{2+} の [3 H] TCP 結合促進効果に対して相加的に作用し、しかも、L-グルタミン酸は Mg^{2+} で活性化された [3 H] TCP 結合の親和性を著明に高

親和性側にシフトさせた (図 2)。

II. [3 H]TCP 結合に対する競合的 NMDA アンタゴニストの結果

競合的 NMDA アンタゴニストである CPP および D-AP5 は、L-グルタミン酸、グリシンおよび Mg^{2+} 非存在下での [3 H]TCP 結合には影響を与えなかった。しかし、CPP および D-AP5 は低濃度の Mg^{2+} によって活性化された [3 H]TCP 結合を強く抑制した (図 3)。 Mg^{2+} によって活性化された [3 H]TCP 結合に対する CPP の拮抗は非競合的であった (図 4)。

次に、1 μ M L-グルタミン酸、1 μ M グリシンおよび 300 μ M Mg^{2+} によって活性化される [3 H]TCP 結合に対する CPP の拮抗作用を比較した。CPP は濃度依存性に 1 μ M L-グルタミン酸、1 μ M グリシンおよび 300 μ M Mg^{2+} によって活性化される [3 H]TCP

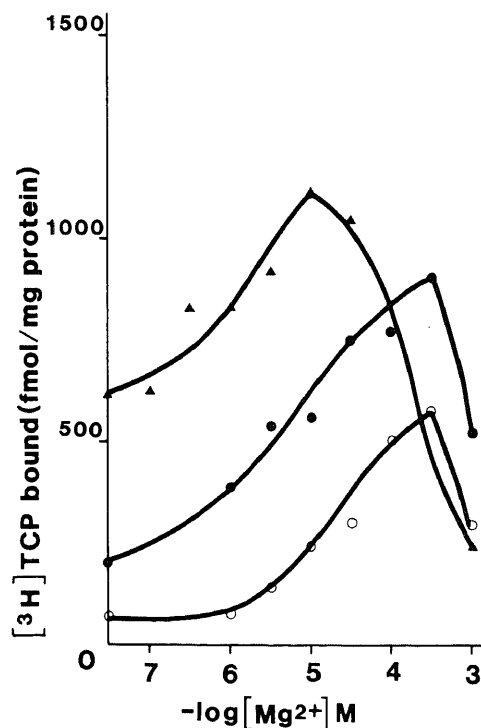


Fig. 2. Effects of Mg^{2+} on the specific binding of [3 H]TCP. [3 H]TCP binding assays were conducted with increasing concentrations of Mg^{2+} in the absence (○) or in the presence of 10 μ M glycine (●) and 10 μ M L-glutamate (▲). The results are the averages of triplicate determinations from a representative experiment that was repeated three times with similar results.

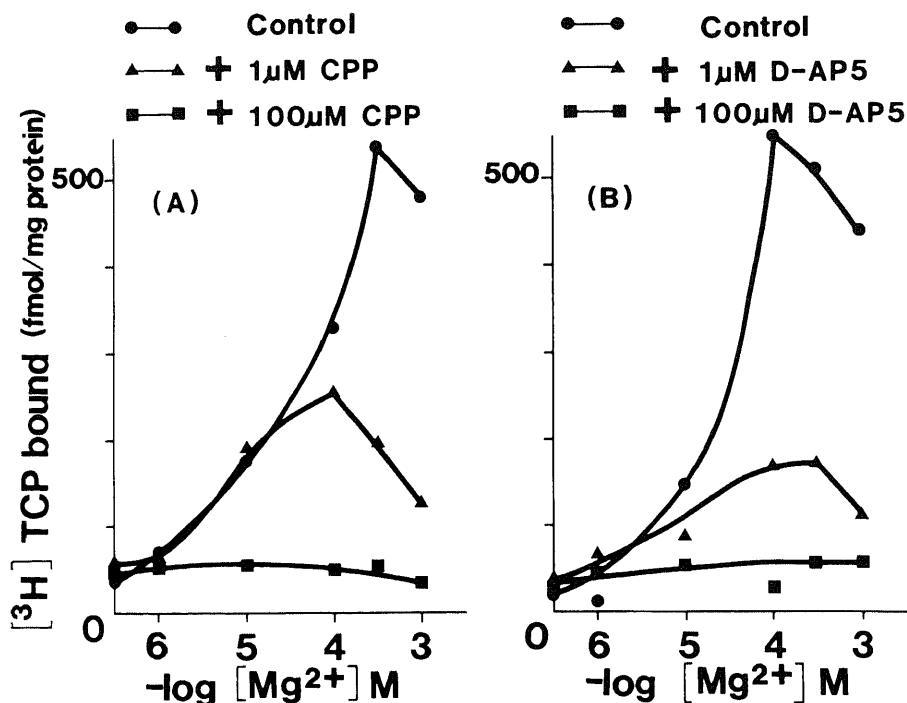


Fig. 3. Effects of CPP and D-AP5 on Mg^{2+} stimulated $[^3H]$ TCP binding. $[^3H]$ -TCP binding assays were conducted with increasing concentrations of Mg^{2+} in the presence of CPP and D-AP5 at concentrations of $1 \mu M$ and $100 \mu M$. The results are the averages of triplicate determinations from a representative experiment that was repeated three times with similar results.

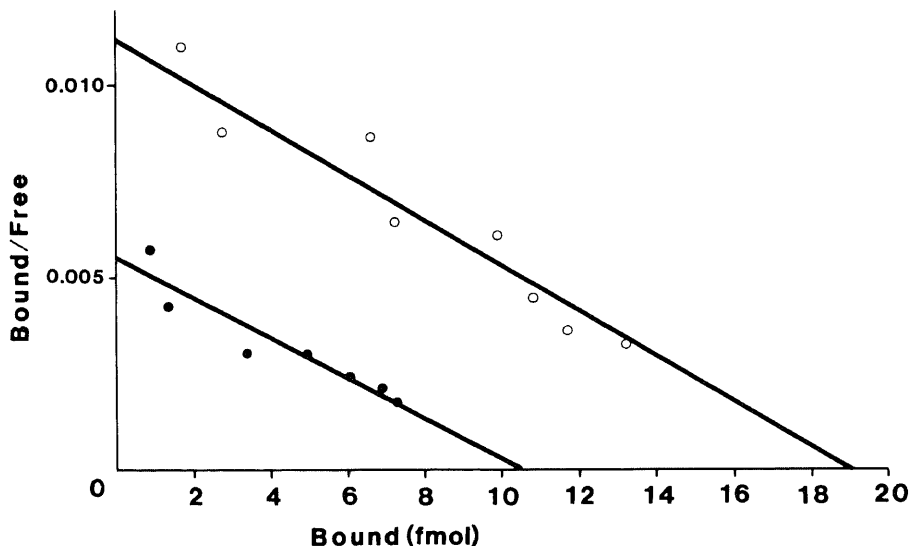


Fig. 4. Scatchard plots of $[^3H]$ TCP binding in the presence or absence of CPP. $[^3H]$ TCP binding was measured in the following reaction mixture: 5mM Tris-HEPES buffer, pH 7.6, 5nM $[^3H]$ TCP, $300 \mu M$ $MgSO_4$, with (●) or without (○) $0.5 \mu M$ CPP at $23^\circ C$ for 1 hour. Nonspecific binding was defined with $30 \mu M$ CPP. The results were from a single representative experiment from a total of three experiments, each performed in triplicate.

結合に対して抑制的に作用したが (図 5A), 興味あることに, Mg^{2+} によって活性化される $[^3H]$ TCP 結合が最も強く抑制された. その順序は, $Mg^{2+} > \text{グリシン} > \text{L-グルタミン酸}$ であり, グリシンによって活性化される $[^3H]$ TCP 結合に対する CPP の抑制は Mg^{2+} に

よるそれに比べて約1/10, L-グルタミン酸によって活性化される $[^3H]$ TCP 結合に対する抑制は約1/100であった (表 1). 同様の結果が D-AP5, D, L-AP7, L-AP5 の抑制効果についても得られた (図 5B, C, D). Mg^{2+} によって活性化される $[^3H]$ TCP 結合に対する

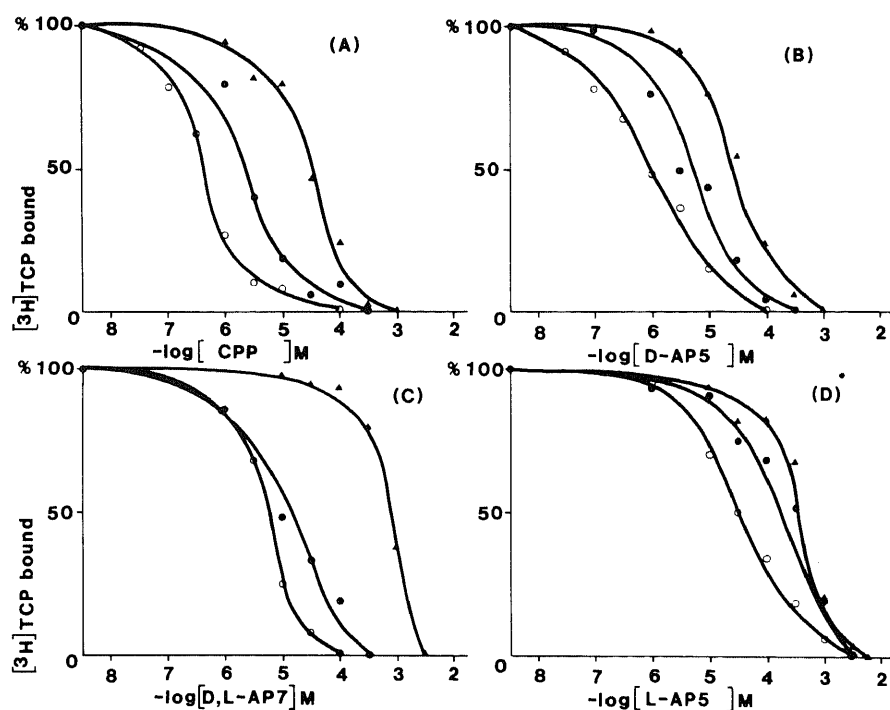


Fig. 5. Effects of competitive NMDA antagonists including CPP, D-AP5, D, L-AP7 and L-AP5 on the specific binding of $[^3H]$ TCP. $[^3H]$ TCP binding assays were conducted with increasing concentrations of CPP (A), D-AP5 (B), D, L-AP7 (C) and L-AP5 (D) in the presence of $300 \mu M$ Mg^{2+} (○), $1 \mu M$ glycine (●) and $1 \mu M$ L-glutamate (▲). The results are one representative experiment from at least three times separate experiments each performed in triplicate.

Table 1. The IC_{50} values of competitive NMDA antagonists for $[^3H]$ TCP binding stimulated by $300 \mu M$ Mg^{2+} , $1 \mu M$ glycine or $1 \mu M$ L-glutamate

drug	IC_{50} (μM)			
	control	Mg^{2+}	glycine	L-glutamate
CPP	NI	0.427 ± 0.043	4.60 ± 1.03	36.0 ± 3.8
D-AP5	NI	0.626 ± 0.187	5.76 ± 2.43	27.3 ± 9.2
L-AP5	NI	55.1 ± 20.3	238 ± 53	449 ± 177
D, L-AP7	NI	4.16 ± 0.70	16.2 ± 5.2	818 ± 145

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of at least three separate experiments done in triplicate. The IC_{50} value is the value of the cold ligand concentration which reduces the specific binding of the hot ligand by 50% of its initial value. NI, no inhibition.

抑制効果は CPP および D-AP5 が最も強く、その程度はほぼ同じであった (表 1)。

Ⅲ. [^3H]TCP 結合に対するグリシンアンタゴニストの効果

1 μM L-グルタミン酸, 1 μM グリシンおよび 300 μM Mg^{2+} によって活性化される [^3H]TCP 結合に対する 3 種類の選択的グリシンアンタゴニスト,

DCQX, 7-ClKYNA および HA-966 の影響を, 図 6 および表 2 に示した. 検討した 3 種類のアンタゴニストのいずれも L-グルタミン酸, グリシンおよび Mg^{2+} 非存在下での [^3H]TCP 結合に影響を与えなかった (表 2). DCQX は, L-グルタミン酸および Mg^{2+} によって活性化される [^3H]TCP 結合に対する抑制に比べて, グリシンによって活性化される [^3H]TCP 結合を最も

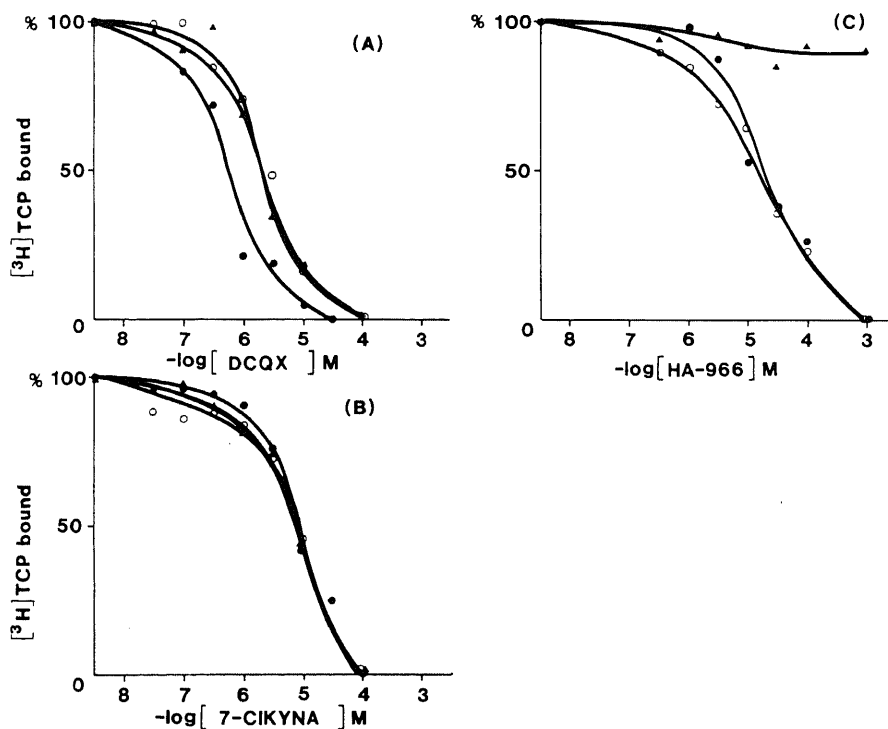


Fig. 6. Effects of selective glycine antagonists including DCQX, 7-ClKYNA and HA-966 on the specific binding of [^3H]TCP. [^3H]TCP binding assays were conducted with increasing concentrations of DCQX (A), 7-ClKYNA (B) and HA-966 (C) in the presence of 300 μM Mg^{2+} (○), 1 μM glycine (●) and 1 μM L-glutamate (▲). The results are one representative experiment from at least three times separate experiments each run in triplicate.

Table 2. The IC_{50} values of selective glycine antagonists for [^3H]TCP binding stimulated by 300 μM Mg^{2+} , 1 μM glycine or 1 μM L-glutamate

drug	IC_{50} (μM)			
	control	Mg^{2+}	glycine	L-glutamate
DCQX	NI	2.90 ± 0.14	0.734 ± 0.305	2.21 ± 0.81
7-ClKYNA	NI	5.63 ± 1.65	5.94 ± 0.88	4.62 ± 1.85
HA-966	NI	13.7 ± 1.2	10.3 ± 0.9	NI

The results are expressed as the mean $\pm$ S.E. for at least three experiments each performed in triplicate. NI, no inhibition.

抑制した。HA-966 は、グリシンおよび Mg^{2+} によって活性化される $[^3H]$ TCP 結合を同程度に抑制したが、L-グルタミン酸による $[^3H]$ TCP 結合の活性化に対しては抑制的に作用しなかった。7-ClKYNA は L-グルタミン酸、グリシンおよび Mg^{2+} による $[^3H]$ TCP 結合の活性化をともに抑制したが、抑制の程度に有意な差は認められなかった。 Mg^{2+} によって活性化される $[^3H]$ TCP 結合に対する 3 種類のグリシンアンタゴニストの抑制の程度を比較すると、DCQX が最も強かった (表 2)。

考 察

本研究で使用した大脳皮質よりの膜標品は、 $[^3H]$ -TCP 結合に影響を与える内因性因子、例えば L-グルタミン酸やグリシンなどを除去する目的で凍結・解凍、ブレインキューベーションに加えて頻回な洗浄といった操作を行って調製された。その結果、L-グルタミン酸による活性化の程度は、過去の報告^{52)~56)}の 2 倍に達し、また、グリシンについても同じように過去の報告⁵⁴⁾⁵⁷⁾に比べて $[^3H]$ TCP 結合活性化の程度が著しかった。これらの結果は、NMDA/PCP レセプターイオンチャンネル複合体上に高親和性 Mg^{2+} 結合部位の存在を初めて示唆した Hori らの報告³⁰⁾の成績と一致する。また、強力な競合的 NMDA アンタゴニストである CPP, D-AP5 および D, L-AP7 は、過去の報告^{52)53)57)~59)}と異なり、 $[^3H]$ TCP 結合に影響を与えなかった。選択的グリシンアンタゴニストである DCQX, 7-ClKYNA および HA-966 でも同じような結果であった。以上述べてきた本研究で得られた結果は、 $[^3H]$ TCP 結合に影響を与える内因性因子と考えられている L-グルタミン酸やグリシンが今回用いた膜標品からは十分除去されていることを意味する。Hori らは、このような膜標品を使用することによって低濃度 Mg^{2+} による $[^3H]$ TCP 結合活性化の効果を過去の報告³⁰⁾⁵²⁾⁵⁴⁾⁵⁶⁾⁶¹⁾に比べてより鮮明に認め、従来から知られているイオンチャンネル内に存在し、電位依存性に $[^3H]$ TCP 結合を阻害する Mg^{2+} 結合部位の他に、内因性アミノ酸が十分に除去されていない膜標品では十分に識別が困難であった高親和性 Mg^{2+} 結合部位が存在することを指摘した。

さて、高親和性 Mg^{2+} 結合部位とグルタミン酸結合部位 (あるいは NMDA レセプター) とグリシン結合部位との関連性が示唆されていることは既に述べた通りである³⁰⁾。しかし、未だ高親和性 Mg^{2+} 結合部位の薬理的性質は全く不明である。本研究では、先ず高親和性 Mg^{2+} 結合部位とグルタミン酸結合部位の機能的

(あるいは解剖学的) 相互関係を明らかにする目的で低濃度 Mg^{2+} および L-グルタミン酸による $[^3H]$ -TCP 結合活性化に対する競合的 NMDA アンタゴニストの影響について比較検討した。その結果、CPP, D-AP5, D, L-AP7 のいずれもが L-グルタミン酸による $[^3H]$ TCP 結合活性化に対してだけでなく、高親和性 Mg^{2+} 結合部位を介する活性化に対しても濃度依存性に抑制した。さらに注目すべきことは、いずれの NMDA アンタゴニストも高親和性 Mg^{2+} 結合部位を介する $[^3H]$ TCP 結合活性化に対する抑制が L-グルタミン酸による $[^3H]$ TCP 結合活性化に対する抑制に比べて 50~200 倍強かったことである。このことは、強力な競合的 NMDA アンタゴニストと考えられてきた CPP, D-AP5, D, L-AP7 がグリタミン酸結合部位よりむしろ高親和性 Mg^{2+} 結合部位に対して強い親和性を有することを示唆している。

最近、NMDA レセプターの脳内分布が NMDA アゴニストである L- $[^3H]$ glutamate によって標識されるものと NMDA アンタゴニストである $[^3H]$ CPP による標識で得られたものとの間で異なるという報告がなされた³⁰⁾⁶²⁾。また、L- $[^3H]$ glutamate が結合する部位の分子量は 121,000Da であり、 $[^3H]$ CPP 結合部位の分子量 209,000Da と比較してはるかに小さいという報告もある⁶³⁾。これらの知見は、競合的 NMDA アンタゴニストが NMDA アゴニスト結合部位と異なる部位を認識している可能性を示唆している⁶²⁾⁶³⁾。競合的 NMDA アンタゴニストがグルタミン酸結合部位 (あるいは NMDA レセプター) を介する $[^3H]$ TCP 結合よりむしろ高親和性 Mg^{2+} 結合部位を介する $[^3H]$ -TCP 結合を選択的に抑制したという本研究での成績は、上述の推論を強く支持する知見であるだけでなく、さらに、高親和性 Mg^{2+} 結合部位の存在、同部位と競合的 NMDA アンタゴニスト結合部位が機能的にきわめて密接な相互調節作用を有することを示唆している。

ところで最近、1 μ M のグリシンによる $[^3H]$ TCP 結合の活性化が 50 μ M の D-AP7 によって完全に抑制されると報告されている⁶⁴⁾。本研究でも、検討したいずれの競合的 NMDA アンタゴニストもグリシンによって活性化される $[^3H]$ TCP 結合を濃度依存性に抑制し、しかも μ M オーダーの濃度で $[^3H]$ TCP 結合を完全に抑制した。この成績は、競合的 NMDA アンタゴニストがグリシン結合部位にも作用する可能性を示唆している。しかし、D-AP5, D-AP7 は、 $[^3H]$ -glycine 結合に対しては 50% 前後の抑制しか示さなかったとの報告がある⁶⁵⁾。AP5 は $[^3H]$ glycine 結合を

完全に抑制するが、 IC_{50} は $148\mu M$ と高濃度であり、他方、CPPは $1mM$ という高濃度であっても $[^3H]$ -glycine結合を27%しか抑制しなかったという報告もある⁶⁰⁾。また、別の報告では、 $[^3H]$ glycine結合に対するCPPの IC_{50} は $1200\mu M$ であったという⁶¹⁾。以上述べてきた諸家の成績は、競合的NMDAアンタゴニストのグリシン結合部位に対する作用が直接作用でないことを示唆している。したがって、本研究で見いだされたグリシンによる $[^3H]$ TCP結合の活性化に対する競合的NMDAアンタゴニストの抑制作用は間接的である可能性が高い。さらに、CPP、D-AP5、D、L-AP7のいずれもグリシンによって活性化される $[^3H]$ TCP結合に対する抑制がL-グルタミン酸による $[^3H]$ -TCP結合の活性化に対する抑制より5~50倍強いという結果が得られた。このような結果はどのような機序によるものか現在のところ不明であり、高親和性 Mg^{2+} 結合部位、L-グルタミン酸結合部位、グリシン結合部位との間の相互調節作用をさらに詳細に検討することが必要である。

今回調べた3種類の選択的グリシンアンタゴニストのグリシンおよびL-グルタミン酸による $[^3H]$ TCP結合の活性化に対する抑制作用の程度は諸家の報告⁴⁵⁾⁶⁰⁾とおおむね一致していた。一方、これら3種類のグリシンアンタゴニストの高親和性 Mg^{2+} 結合部位に対する作用に関する研究は未だ報告されていない。検討したいずれのグリシンアンタゴニストも高親和性 Mg^{2+} 結合部位を介して活性化される $[^3H]$ TCP結合を完全に抑制した。特に注目されるのは、従来の報告⁴⁵⁾⁶⁰⁾⁶⁹⁾の通りHA-966はL-グルタミン酸結合部位には作用しないにも拘らず、グリシンによって活性化される $[^3H]$ TCP結合とほぼ同程度に低濃度の Mg^{2+} によって活性化される $[^3H]$ TCP結合を抑制したことである。これらの結果は、高親和性 Mg^{2+} 結合部位の存在がより確かなものであることを示唆しており、さらに高親和性 Mg^{2+} 結合部位とグリシン結合部位との間に緊密な相互調節作用が存在することを窺わせる。

結 論

非常によく洗浄したラット大脳皮質の膜標品に対する $[^3H]$ TCP結合を指標として、NMDA/PCPレセプターイオンチャンネル複合体における高親和性 Mg^{2+} 結合部位の性質を競合的NMDAアンタゴニストおよび選択的グリシンアンタゴニストを用いて調べたところ、以下の知見が得られた。

1. $1\mu M$ L-グルタミン酸、 $1\mu M$ グリシンおよび $300\mu M$ Mg^{2+} によって活性化される $[^3H]$ TCP結

合に対する競合的NMDAアンタゴニストであるCPP、D-AP5およびD、L-AP7の影響を比較したところ、いずれのNMDAアンタゴニストもそれぞれ濃度依存性に $[^3H]$ TCP結合活性化を完全に抑制した。いずれのNMDAアンタゴニストも低濃度の Mg^{2+} による $[^3H]$ TCP結合の活性化を最も強く抑制し、その順序は、 $Mg^{2+} > \text{グリシン} > \text{L-グルタミン酸}$ であった。

2. $1\mu M$ L-グルタミン酸、 $1\mu M$ グリシンおよび $300\mu M$ Mg^{2+} によって活性化される $[^3H]$ TCP結合に対する選択的グリシンアンタゴニストであるDCQX、7-ClKYNAおよびHA-966の作用は以下の通りであった。DCQXはL-グルタミン酸および Mg^{2+} による $[^3H]$ TCP結合活性化に対する抑制に比べてグリシンによって活性化される $[^3H]$ TCP結合を最も強く抑制した。HA-966はグリシンおよび Mg^{2+} によって活性化される $[^3H]$ TCP結合を同程度に抑制したが、L-グルタミン酸による $[^3H]$ TCP結合の活性化に対して抑制を示さなかった。7-ClKYNAはL-グルタミン酸、グリシンおよび Mg^{2+} によって活性化される $[^3H]$ TCP結合を同程度に抑制した。

3. Mg^{2+} によって活性化される $[^3H]$ TCP結合に対する抑制効果は、 $CPP \approx D-AP5 > DCQX > D, L-AP7 > 7-ClKYNA > HA-966$ の順序であった。

以上の結果は、NMDA/PCPレセプターイオンチャンネル複合体に高親和性 Mg^{2+} 結合部位が存在するという推論を強く支持する知見であり、また同部位と競合的NMDAアンタゴニスト結合部位が機能的にきわめて密接な相互調節作用を有することを示している。さらに高親和性 Mg^{2+} 結合部位がグリシン結合部位との間にも緊密な相互調節作用を有することが推測される。

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、横浜市立大学大学院総合理学研究科山本敏文助教授、筑波大学附属病院精神神経科堀孝文先生に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第17回国際神経精神薬理学会サテライトシンポジウム(名古屋、1990)において発表した。

文 献

- 1) Snyder, S. H.: Phencyclidine. *Nature*, 285, 355-356 (1980).
- 2) Contreras, P. C., Monahan, J. B., Lanthorn, T. H., Pullan, L. M., DiMaggio, D. A.,

- Handelmann, G. E., Gray, N. M. & O'Donohue, T. L.: Phencyclidine. *Mol. Neurobiol.*, **1**, 191-211 (1987).
- 3) Allen, R. M. & Young, S. J.: Phencyclidine-induced psychosis. *Am. J. Psychiatry*, **135**, 1081-1084 (1978).
- 4) Rainey, J. M. & Crowder, M. K.: Prolonged psychosis attributed to phencyclidine: Report of three cases. *Am. J. Psychiatry*, **132**, 1076-1078 (1975).
- 5) Luby, E. D., Cohen, B. D., Rosenbaum, G., Gottlieb, J. S. & Kelley, R.: Study of a new schizophrenomimetic drug-Sernyl. *Arch. Neurol. Psychiatry*, **81**, 363-369 (1959).
- 6) Snyder, S. H.: Psychotogenic drugs as models for Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, **1**, 197-199 (1988).
- 7) Vincent, J. P., Kartalovski, B., Geneste, P., Kamenka, J. M. & Lazdunski, M.: Interaction of phencyclidine (angel dust) with a specific receptor in rat brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4678-4682 (1979).
- 8) Zukin, S. R. & Zukin, R. S.: Specific [^3H] phencyclidine binding in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 5372-5376 (1979).
- 9) Sonders, M. S., Keana, J. F. W. & Weber, E.: Phencyclidine and psychotomimetic sigma opiates: recent insights into their biochemical and physiological sites of action. *Trends Neurosci.*, **11**, 37-36 (1988).
- 10) Itzhak, Y.: Different modulation of the binding to two phencyclidine (PCP) receptor subtypes: effects of N-methyl-D-aspartate agonists and antagonists. *Neurosci. Lett.*, **104**, 314-319 (1989).
- 11) Kemp, J. A., Foster, A. C. & Wong, E. H. F.: Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci.*, **10**, 294-298 (1987).
- 12) Foster, A. C. & Fagg, G. E.: Taking apart NMDA receptors. *Nature*, **329**, 395-396 (1987).
- 13) Olney, J. W.: Excitatory amino acid and neuropsychiatric disorders. *Biol. Psychiatry*, **26**, 505-525 (1989).
- 14) Wong, E. H. F., Knight, A. R. & Ransom, R.: Glycine modulates [^3H] MK-801 binding to the NMDA receptor in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **142**, 487-488 (1987).
- 15) Johnson, J. W. & Ascher, P.: Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, **325**, 529-531 (1987).
- 16) Bonhaus, D. W., Burge, B. C. & McNamara, J. O.: Biochemical evidence that glycine allosterically regulates an NMDA receptor-coupled ion channel. *Eur. J. Pharmacol.*, **142**, 489-490 (1987).
- 17) Yeh, G. C., Bonhaus, D. W. & McNamara, J. O.: Evidence that zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor-gated ion channel activation by noncompetitive antagonism of glycine binding. *Mol. Pharmacol.*, **38**, 14-19 (1990).
- 18) Westbrook, G. L.: GABA responses of hippocampal neurons. *Nature*, **328**, 640-643 (1987).
- 19) Reynolds, I. J. & Miller, R. J.: Multiple sites for the regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol. Pharmacol.*, **33**, 581-584 (1988).
- 20) Ransom, R. W. & Stec, N. L.: Cooperative modulation of [^3H] 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).
- 21) Sacaan, A. I. & Johnson, K. M.: Spermine enhances binding to the glycine site associated with the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Mol. Pharmacol.*, **36**, 836-839 (1989).
- 22) Kloog, Y., Haring, R. & Sokolovsky, M.: Kinetic characterization of the phencyclidine-N-methyl-D-aspartate receptor interaction: Evidence for a steric blockade of the channel. *Biochemistry*, **27**, 843-848 (1988).
- 23) Ascher, P. & Nowak, L.: Electrophysiological studies of NMDA receptors. *Trends Neurosci.*, **10**, 284-288 (1987).
- 24) Foster, A. C. & Kemp, J. A.: Glycine maintains excitement. *Nature*, **338**, 377-378 (1989).
- 25) Monahan, J. B., Corpus, V. M., Hood, W. F., Thomas, J. W. & Compton, R. P.: Characterization of a [^3H] glycine recognition site as a modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *J. Neurochem.*, **53**, 370-375 (1989).
- 26) Compton, R. P., Hood, W. F. & Monahan,

- J. B.: Evidence for a functional coupling of the NMDA and glycine recognition site in synaptic plasma membranes. *Eur. J. Pharmacol.*, **188**, 63-70 (1990).
- 27) Kessler, M., Terramani, T., Lynch, G. & Baudly, M.: A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: Characterization and identification of a new class of antagonists. *J. Neurochem.*, **52**, 1319-1328 (1989).
- 28) Bonhaus, D. W., Yeh, G. C., Skaryak, L. & McNamara, J. O.: Glycine regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor-gated ion channel in hippocampal membranes. *Mol. Pharmacol.*, **36**, 273-279 (1989).
- 29) Nowak, L., Ascher, P., Herbet, A. & Prochiantz, A.: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, **307**, 462-465 (1984).
- 30) Mayer, M. L., Westbrook, G. L. & Guthrie, P. G.: Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, **309**, 261-263 (1984).
- 31) Mayer, M. L. & Westbrook, G. L.: Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol.*, **394**, 501-527 (1987).
- 32) Ascher, P. & Nowak, L.: The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J. Physiol.*, **399**, 247-266 (1988).
- 33) Vignon, J., Vincent, J. P., Bidard, J. N., Kamenka, J. M., Geneste, P., Monier, S. & Lazdunski, M.: Biochemical properties of the brain phencyclidine receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **81**, 531-542 (1982).
- 34) Vignon, J., Chicheportiche, R., Chicheportiche, M., Kamenka, J. M., Geneste, P. & Lazdunski, M.: [3H]TCP: a new tool with high affinity for the PCP receptor in rat brain. *Brain Res.*, **280**, 194-197 (1983).
- Hori, T., Yamamoto, T., Hatta, K. & Moroji, T.: Biphasic effects of magnesium on the [3H]TCP binding in the rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.*, (in press).
- 36) Johnson, K. M., Sacca, A. I. & Snell, L. D.: Equilibrium analysis on [3H]TCP binding: effects of glycine, magnesium and N-methyl-D-aspartate agonists. *Eur. J. Pharmacol.*, **152**, 141-146 (1988).
- 37) Marvizon, J. C. G. & Skolnick, P.: [3H]glycine binding is modulated by Mg^{2+} and other ligands of the NMDA receptor-channel complex. *Eur. J. Pharmacol.*, **151**, 157-158 (1988).
- 38) Watkins, J. C. & Olverman, H. J.: Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci.*, **10**, 265-272 (1987).
- 39) Lehmann, J., Schneider, J., McPherson, S., Murphy, D. E., Bernard, P., Tsai, C., Bennett, D. A., Pastor, G., Steel, D. J., Boehm, C., Cheney, D. L., Liebman, J. M., Williams, M. & Wood, P. L.: CPP, a selective N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type receptor antagonist: Characterization in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**, 737-746 (1987).
- 40) Davies, J., Evans, R. H., Herring, P. L., Jones, A. W., Olverman, H. J., Pook, P. & Watkins, J. C.: CPP, a new potent and selective NMDA antagonist. Depression of central neuron responses, affinity for [3H] D-AP5 binding sites on brain membranes and anticonvulsant activity. *Brain Res.*, **382**, 169-173 (1986).
- 41) Murphy, D. E., Schneider, J., Boehm, C., Lehmann, J. & Williams, M.: Binding of [3H] 3-(2-carboxypiperazin-4-yl) propyl-phosphonic acid to rat brain membranes: a selective, high-affinity ligand for N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**, 778-784 (1987).
- 42) Davies, J., Francis, A. A., Jones, A. W. & Watkins, J. C.: 2-amino-5-phosphonopentanoate (2AP5), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neurosci. Lett.*, **21**, 77-81 (1981).
- 43) Olverman, H. J., Jones, A. W. & Watkins, J. C.: L-glutamate has higher affinity than other amino acids for [3H] D-AP5 binding sites in rat brain membranes. *Nature*, **307**, 460-462 (1984).
- 44) Perkins, M. N., Stone, T. W., Collins, J. F. & Curry, K.: Phosphonate analogues of carboxylic acids as amino acid antagonists on rat cortical neurones. *Neurosci. Lett.*, **23**, 333-336 (1981).
- 45) Yoneda, Y. & Ogita, K.: Abolition of the

- NMDA-mediated responses by a specific glycine antagonist, 6, 7-dichloroquinoxaline-2, 3-dione (DCQX). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 841-849 (1989).
- 46) Ogita, K. & Yoneda, Y.: 6, 7-Dichloroquinoxaline-2, 3-dione is a competitive antagonist specific to strychnineinsensitive [^3H] glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *J. Neurochem.*, **54**, 699-702 (1990).
- 47) Kemp, J. A., Foster, A. C., Leeson, P. D., Priestley, T., Tridgett, R. & Iversen, L. L.: 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 6547-6550 (1988).
- 48) Sircar, R., Frusciante, M. J., Javitt, D. C. & Zukin, S. R.: Glycine reverses 7-chlorokynurenic acid-induced inhibition of [^3H] MK-801 binding. *Brain Res.*, **504**, 325-327 (1989).
- 49) Foster, A. C. & Kemp, J. A.: HA-966 antagonizes N-methyl-D-aspartate receptors through a selective interaction with the glycine modulatory site. *J. Neurosci.*, **9**, 2191-2196 (1989).
- 50) Fletcher, E. J. & Lodge, D.: Glycine reverses antagonism of N-methyl-D-aspartate (NMDA) by 1-hydroxy-3-aminopyrrolidone-2 (HA-966) but not by D-2-amino-5-phosphonovalerate (D-AP5) on rat cortical slices. *Eur. J. Pharmacol.*, **151**, 161-162 (1988).
- 51) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 52) Hood, W. F., Thomas, J. W., Compton, R. P. & Monahan, J. B.: Guanine nucleotide modulation of [^3H] TCP binding to the NMDA receptor complex. *Eur. J. Pharmacol.*, **188**, 43-49 (1990).
- 53) Loo, P. S., Braunwalder, A. F., Lehmann, J., Williams, M. & Sills, M. A.: Interaction of L-glutamate and magnesium with phencyclidine recognition sites in rat brain: evidence for multiple affinity states of the phencyclidine/N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Mol. Pharmacol.*, **32**, 820-830 (1987).
- 54) McKernan, R. M., Castro, S., Poat, J. A. & Wong, E. H. F.: Solubilization of the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex from rat and porcine brain. *J. Neurochem.*, **52**, 777-785 (1989).
- 55) Loo, P. S., Braunwalder, A. F., Lehmann, J. & Williams, M.: Radioligand binding to central phencyclidine recognition sites is dependent on excitatory amino acid receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.*, **123**, 467-468 (1986).
- 56) Marvizon, J. C. G. & Skolnick, P.: An endogenous modulator of N-methyl-D-aspartate receptor-coupled glycine receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **188**, 23-32 (1990).
- 57) Javitt, D. C. & Zukin, S. R.: Biexponential kinetics of [^3H] MK-801 binding: evidence for access to closed and open N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Mol. Pharmacol.*, **35**, 387-393 (1989).
- 58) Stirling, J. M., Cross, A. J. & Green, A. R.: The binding of [^3H] thienyl cyclohexylpiperidine ([^3H] TCP) to the NMDA-phencyclidine receptor complex. *Neuropharmacology*, **28**, 1-7 (1989).
- 59) Javitt, D. C., Jotkowitz, A., Sircar, R. & Zukin, S. R.: Non-competitive regulation of phencyclidine/ σ -receptors by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist D-(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid. *Neurosci. Lett.*, **78**, 193-198 (1987).
- 60) Wong, E. H. F., Knight, A. R. & Woodruff, G. N.: [^3H] MK-801 labels a site on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex in rat brain membranes. *J. Neurochem.*, **50**, 274-281 (1988).
- 61) Johnson, K. M., Snell, L. D. & Morte, R. S.: N-methyl-D-aspartate enhanced ^3H -TCP binding to rat cortical membranes: effects of divalent cations and glycine. In E. F. Domino J. -M. Kamenka (eds.), *Sigma and Phencyclidine-like Compounds as Molecular Probes in Biology*, 1st ed., p259-268, NPP books, Ann Arbor, 1988.
- 62) Monahan, J. B., Olverman, H., Nguyen, L., Watkins, J. C. & Cotman, C. W.: Two classes of N-methyl-D-aspartate recognition site: Differential distribution and differential regulation by glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9836-9840 (1988).

- 63) Honore, T., Drejer, J., Nielsen, E. Ø., Watkins, J. C., Olverman, H. J. & Nielsen, M.: Molecular target size analyses of the NMDA-receptor complex in rat cortex. *Eur. J. Pharmacol.*, **172**, 239-247 (1989).
- 64) Thomas, J. W., Hood, W. F., Monahan, J. B., Contreras, P. C. & O'Donohue, T. L.: Glycine modulation of the phencyclidine binding site in mammalian brain. *Brain Res.*, **442**, 396-398 (1988).
- 65) Monahan, J. B., Biesterfeldt, J. P., Hood, W. F., Compton, R. P., Cordi, A. A., Vazquez, M. I., Lanthorn, T. H. & Wood, P. L.: Differential modulation of the associated glycine recognition site by competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Mol. Pharmacol.*, **37**, 780-784 (1990).
- 66) Danysz, W., Fadda, E., Wroblewski, J. T. & Costa, E.: Kynurenate and 2-amino-5-phosphonovalerate interact with multiple binding sites of the N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptor domain. *Neurosci. Lett.*, **96**, 340-344 (1989).
- 67) Kaplita, P. V. & Ferkany, J. W.: Evidence for direct interactions between the NMDA and glycine recognition sites in brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **188**, 175-179 (1990).
- 68) Kloog, Y., Lamdani-itkin, H. & Sokolovsky, M.: The glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor channel: differences between the binding of HA-966 and of 7-chlorokynurenic acid. *J. Neurochem.*, **54**, 1576-1583 (1990).
- 69) Danysz, W., Fadda, E., Wroblewski, J. T. & Costa, E.: Different modus of action of 3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone (HA-966) and 7-chlorokynurenic acid in the modulation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.*, **36**, 912-916 (1989).

Studies on the High Affinity Mg^{2+} Binding Site on the NMDA/PCP Receptor Ion Channel Complex Kotaro Hatta, Department of Public Health, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., **99**, 880—893 (1990)

Key words NMDA/PCP receptor ion channel complex, [3H]TCP binding, Mg^{2+} binding site, NMDA antagonist, glycine antagonist

Abstract

Recently, using extensively washed rat cortical membranes, the high affinity Mg^{2+} binding site, through which low concentrations of Mg^{2+} stimulate [3H]TCP binding, has been found on the N-methyl-D-aspartate (NMDA)/phencyclidine (PCP) receptor ion channel complex. In addition, it has been suggested that the high affinity Mg^{2+} binding site may have functional interactions with recognition sites for L-glutamate (or NMDA) and glycine. In order to further clarify the pharmacological properties of the high affinity Mg^{2+} binding site, the effects of competitive NMDA antagonists and selective glycine antagonists on the binding of [3H] N-(1-[2-thienyl] cyclohexyl)-3,4-piperidine ([3H]TCP) were investigated. Competitive NMDA antagonists, 3-(($\pm$)-2-carboxypiperazin-4-yl) propyl-1-phosphonic acid (CPP), D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) and 2-amino-7-phosphonoheptanoate (D, L-AP7), inhibited not only L-glutamate-stimulated [3H]TCP binding but also that stimulated by both Mg^{2+} and glycine in a concentration dependent manner. All the NMDA antagonists tested, completely inhibited the [3H]TCP binding which was stimulated by $1\mu M$ L-glutamate, $1\mu M$ glycine and $300\mu M$ Mg^{2+} , and most potently inhibited Mg^{2+} -stimulated [3H]TCP binding. The order of potency was Mg^{2+} ->glycine->L-glutamate-stimulated [3H]TCP binding. Selective glycine antagonists, 6, 7-dichloroquinoxaline-2, 3-dione (DCQX), 7-chlorokynurenic acid (7-ClKYNA) and 3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone (HA-966), inhibited not

only glycine-stimulated [^3H]TCP binding but also that stimulated by Mg^{2+} in a concentration dependent manner. DCQX and 7-ClKYNA, but not HA-966, completely inhibited L-glutamate-stimulated [^3H]TCP binding. These findings support the theory that the high affinity Mg^{2+} binding site exists on the NMDA/PCP receptor ion channel complex, and suggest that the high affinity Mg^{2+} binding site functionally interacts with the recognition site for the competitive NMDA antagonist in a reciprocal fashion. In addition, a functional interaction between the high affinity Mg^{2+} binding site and glycine site are also indicated.