

D-アミノ酸による N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体活性増強に関する薬理学的検討： アフリカツメガエル卵による遺伝子発現系での解析

松井 隆明

近畿大学医学部第3内科学教室

抄 録

高次脳機能の形成および維持に密接に関与する NMDA 受容体に対する内在性 D-アミノ酸 (D-セリン, D-アラニン, D-アスパラギン酸) によるアゴニスト活性増強作用を薬理学的に検討した。アフリカツメガエル卵母細胞に遺伝子工学的に発現させたクローン化 NMDA 受容体を介するグルタミン酸誘起膜電流を 2 電極膜電位固定法により記録, この膜電流に対する D-アミノ酸の作用を調べた。D-セリンと D-アラニンはグルタミン酸誘起電流を増強した。特に, D-セリンはこれまで NMDA 受容体の唯一内在性増強物質として知られているグリシンより 3-4 倍高いみかけの親和性を示した。内在性 D-アミノ酸のひとつである D-セリンは中枢神経系においてグリシン同様 NMDA 受容体を介した神経機能の修飾に関与している可能性が示唆された。

Key words: グルタミン酸受容体, D-アミノ酸, D-セリン, 膜電位固定法, 部位特異的突然変異法

結 言

グルタミン酸は, 高等動物の中枢神経系における興奮性シナプス伝達に関与している神経伝達物質である。その受容体チャンネルはイオンチャンネル型受容体と代謝調節型受容体の 2 種類に大別される。前者は薬理学的なアゴニスト特異性に基づき, NMDA 型, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) 型, Kainate (KA) 型の 3 つのサブタイプに分類される¹。このうち特に NMDA 型受容体チャンネルは, 記憶・学習の基礎と考えられているシナプス可塑性に重要な分子であることが報告されている²⁻⁶。臨床的にも NMDA チャンネルの異常な活性化は, 脳虚血やてんかん重積発作状態などの病態で発生する急性の脳障害やアルツハイマー病, またはハンチントン舞踏病など慢性疾患にみられる神経細胞壊死に深く関与していると考えられている⁷⁻⁹。しかし, その機能発現や発現調節についてはまだ解明されていない不明な点が多い。

NMDA 型受容体チャンネルの内在性活性増強物質としては, これまでグリシンが知られているのみ

であった¹⁰。しかし, 以前から, グリシン以外にもいくつかの D-アミノ酸が NMDA 受容体チャンネルの活性を増強させることが指摘されていた³⁻⁶。長い間 D-アミノ酸は高等動物には存在しないものと考えられてきたが¹¹, 近年いくつかの D-アミノ酸 (D-セリン, D-アラニン, D-アスパラギン酸) が高等動物の組織内に存在することが報告された¹²⁻¹⁶。特に D-セリンは, その多くが脳選択的に集積しており, 脊髄や末梢組織には低レベルか痕跡程度しか認められず, その脳内分布も NMDA 受容体の脳分布と相関があることから NMDA 受容体チャンネルとの関係が示唆されている¹⁷。また D-セリンは NMDA 受容体を介する神経細胞死を増強させることも報告されている¹⁸。しかし, D-アミノ酸の NMDA 受容体に対する生理的役割についてはいまだ解明されていない点が多い。

今回, アフリカツメガエルの卵母細胞発現系を用いて, クローン化したマウス NMDA 受容体サブユニットの内在性 D-アミノ酸に対する応答を電気生理学的に検討した。さらに, 最近ラット NMDAR1 サブユニット¹⁹ 配列のいくつかのアミノ酸残基が,

グリシンのアゴニスト活性増強作用に影響を与える事が報告された²⁰。それらのアミノ酸残基がD-アミノ酸の活性にも影響を与えるかどうか調べるために、部位特異的突然変異法 (site-directed mutagenesis) を用いてマウス NMDA 受容体チャンネルの一つのサブユニット ($\xi 1$; これはラット NMDAR1 に相当する) においてそのアミノ酸残基のいくつかを他のアミノ酸に置換した変異体を調整した。この変異体について電気生理学的に検討し、D-アミノ酸の作用を野生型サブユニットと比較した。

方 法

卵母細胞での NMDA 受容体の発現

マウス NMDA 型受容体のサブユニットである $\xi 1$, $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ をコードする cDNA を挿入したプラスミドを使用した。これらのプラスミドをそれぞれ制限酵素 ($\xi 1$, $\epsilon 1$, $\epsilon 2$ は NotI, $\epsilon 3$ は XbaI, $\epsilon 4$ は EcoRI を使用) で切断し、プロテアーゼ K にて37度, 30分間処理した。これらの切断したプラスミドに RNA ポリメラーゼ ($\xi 1$, $\epsilon 1$ – $\epsilon 3$ は T3 ポリメラーゼ, $\epsilon 4$ は SP6 ポリメラーゼを使用, Stratagene 社) を加えて37度, 1時間反応, DNaseI で37度, 15分で消化後, その反応液をフェノールとクロロホルムの混合液 (1 : 1), クロロホルムの順で洗浄した。その後, エタノール沈殿にて RNA 転写物 (cRNA) を沈殿させ, 滅菌水にて溶解した。RNA 濃度は, 分光光度計を使用し 1.0 mg/ml に調整した²¹。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を氷冷下におき低温麻酔後, 下腹部を切開し, 卵母細胞塊を摘出した。摘出した細胞塊をコラゲナーゼ (3 mg/ml, Sigma) を含むカルシウムイオン無添加カエル用リンゲル氏液 [frog Ringer's solution (FR), 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES (PH 7.4), 0.1 mM EGTA] に入れ, 室温で2時間よく振盪し, 卵母細胞の周囲の濾胞細胞を除去した。これらの卵母細胞を Modified Barth's Medium [MBM, 88 mM NaCl, 5 mM HEPES (PH 7.4), 2.4 mM NaHCO₃, 1 mM KCl, 0.82 mM MgSO₄, 0.3 mM Ca (CO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, ストレプトマイシン 10 mg/ml, ゲンタマイシン 5 mg/ml] にて洗浄, コラゲナーゼ溶液を取り除いた。卵母細胞を MBM から取り出し, マイクロインジェクション用のメッシュ付きプレートの上に並べた。マイクロマニピレーターにセットしたガラス微小ピペットを使用し, 実体顕微鏡下で cRNA を個々の卵母細胞に注入した (50 ng/一個の卵母細胞)。cRNA を注入した卵母細胞を再度 MBM に入れ, 20度で3か

ら4日間培養。

膜電位固定法

培養後の卵母細胞を灌流槽内に置き, 5 mM CaCl₂ 含 FR にて灌流した。実体顕微鏡下でマニピレーターに固定した2本の微小電極 (3 M KCl を充填, 1 M Ω) を卵母細胞に刺入した。不関電極は灌流液中に寒天ブリッジを介して設置した。電位固定記録装置は AXOCLAMP-2A (Axon Instruments 社) を使用した。記録装置のスイッチを電位固定側に切り替え, 記録を開始後, 膜電流の安定を待って薬剤を投与した。薬剤は 5 mM CaCl₂ 含 FR に溶解して灌流投与した。L-グルタミン酸, グリシンは和光純薬から購入した。D-, L-セリン, D-アラニン, D-アスパラギン酸はナカライから購入した。また, 使用した全ての水は和光純薬から購入した Distilled Water を使用した。

部位特異的突然変異法

$\xi 1$ をコードする cDNA を挿入したプラスミドに Kunkel 法²² に準拠した市販の MUTAGENE Kit (Bio-Rad) を使用し一塩基置換を導入した。置換した cDNA は, すべて A.L.F.DNA シークエンサー (Pharmacia) にて配列を確認した。

成 績

齧歯類脳内の前脳部組織に内在性の遊離型 D-セリンが豊富に存在していることが, 以前に gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) や high-performance liquid chromatography (HPLC) 法を用いて報告されている¹⁷。本研究では, 前脳部に局在性が高い $\epsilon 2$ サブユニットと $\xi 1$ サブユニットの組み合わせにより形成される NMDA 受容体チャンネル²³ を中心に D-アミノ酸の薬理学的効果を比較検討した。

図1で示すとおり, $\epsilon 2/\xi 1$ NMDA 受容体チャンネルにおいて単独で与えた 10 μ M のグルタミン酸に対する活性は軽度であった。しかし, 10 μ M のグルタミン酸に 10 μ M の D-セリンを加えることにより $\epsilon 2/\xi 1$ チャンネルの活性はグルタミン酸単独投与に比べ300%以上の活性を示した。この活性は 10 μ M グルタミン酸に 10 μ M のグリシンを加え投与したものと同程度である。10 μ M D-アラニンを添加した場合は, グルタミン酸単独投与に比べて150%以上の活性の上昇を示した。しかし, 10 μ M D-アスパラギン酸添加では活性の上昇を示さなかった。また, 10 μ M グルタミン酸に 10 μ M L-セリンを加えることにより活性の増強が認められたが, D体と比較す

表1 アミノ酸に対する $\epsilon 1/\zeta 1$, $\epsilon 2/\zeta 1$, $\epsilon 3/\zeta 1$, $\epsilon 4/\zeta 1$ 各チャンネルの電流応答

	Glu+D-Ser	Glu+D-Ala	Glu+D-Asp	Glu+L-Ser	Glu+Gly	D-Ser	D-Ala	D-Asp	L-Ser	Gly	Glu
$\epsilon 1/\zeta 1$	5.12±0.15	3.12±0.05	1.01±0.50	1.62±0.13	5.81±0.59	0.60±0.16	0.51±0.20	0	0.25±0.08	0.30±0.06	1.00
$\epsilon 2/\zeta 1$	6.90±1.23	3.50±0.12	0.82±0.41	3.58±0.95	6.80±0.91	0.69±0.26	0.46±0.15	0.02±0.01	0.09±0.09	0.24±0.11	1.00
$\epsilon 3/\zeta 1$	8.07±0.52	4.20±1.01	0.98±0.36	4.00±1.37	6.84±1.21	0.68±0.29	0.30±0.20	0	0.12±0.19	0.26±0.20	1.00
$\epsilon 4/\zeta 1$	1.70±0.03	2.10±0.50	1.02±0.51	1.20±0.03	1.72±0.09	0.23±0.05	0.19±0.11	0	0.10±0.01	0.12±0.02	1.00

各値は10 μM Glu 投与により得られた電流応答の対比値である。各値は8-12個の卵母細胞から得られた値の平均値±標準誤差である。すべてのアゴニストの濃度は10 μM である。

ると弱い結果を示した(図1)。D-セリンやD-アラニンは単独投与にても $\epsilon 2/\zeta 1$ チャンネルの活性を軽度上昇させ、それら自体が単独でNMDA受容体チャンネルの弱いアゴニストであることが推察された。

$\zeta 1$ サブユニットと $\epsilon 2$ 以外の他の3種類の ϵ サブユニットの組み合わせ($\epsilon 1/\zeta 1$, $\epsilon 3/\zeta 1$, $\epsilon 4/\zeta 1$)に関しても上記と同様の方法を用いて検討した。D-アミノ酸単独投与の場合ならびにグルタミン酸にD-アミノ酸を追加投与した場合のいずれにおいても $\epsilon 2/\zeta 1$ チャンネルと類似した結果を得た(表1)。

10 μM グルタミン酸存在下で10 μM のD-セリンが10 μM のグリシンと同程度の活性を示したことから、さらにD-セリンとグリシンの活性を詳細に比較検討した。各 ϵ サブユニットと $\zeta 1$ サブユニットを形成するNMDA受容体チャンネル($\epsilon 1/\zeta 1$, $\epsilon 2/\zeta 1$, $\epsilon 3/\zeta 1$, $\epsilon 4/\zeta 1$)のD-セリンとグリシンに対する濃度-応答曲線を図2に示した。D-セリンおよびグリシンの親和性は共に $\epsilon 4/\zeta 1$ チャンネル> $\epsilon 3/\zeta 1$ チャンネル> $\epsilon 2/\zeta 1$ チャンネル> $\epsilon 1/\zeta 1$ チャンネルの順であった(図2A, B)。この曲線から算出したD-セリンのED50値は、 $\epsilon 4/\zeta 1$, $\epsilon 3/\zeta 1$, $\epsilon 2/\zeta 1$, $\epsilon 1/\zeta 1$ の順にそれぞれ0.17 μM , 0.21 μM , 0.26 μM , 0.32 μM であった。また、グリシンのED50値は、0.56 μM , 0.76 μM , 0.84 μM , 0.97 μM であった。Hill係数は1.5-1.8程度であった。この結果、それぞれのサブユニットの組み合わせにおいてD-セリンはNMDA受容体チャンネルに対する既知の内性増強物質であるグリシンと比較して3-4倍高い親和性を有することがわかる。また同一卵、同濃度(0.35 μM)においてD-セリンとグリシンの活性を比較しても同様にD-セリンの親和性が高い結果となった(データ未発表)。このことから今回の結果はアフリカツメガエルの卵母細胞の個体差によるものではないことが示された。なお、今回の実験で使用したDistilled Waterは、HPLC法による分析の結果グリシンの混在が0.03 μM 未満でありNMDA受容体チャンネルの活性に無視できるような値であることがわかった。また、L-セリンに関しても同様の方法を用いて濃度-応答曲線を示した(図2C)。各チャンネルの親和性の順はD-体と同様に $\epsilon 4/\zeta 1$ チャンネル> $\epsilon 3/\zeta 1$ チャンネル> $\epsilon 2/\zeta 1$ チャンネル> $\epsilon 1/\zeta 1$ チャンネルの順であった。しかし、ED50値はそれぞれ5.44 μM , 10.3 μM , 15.3 μM , 23.6 μM を示し、D体と比較して50倍以上高かった。

最近、Kuryatovらの報告²⁰でラットNMDAR1サブユニットの配列のいくつかのアミノ酸残基が、

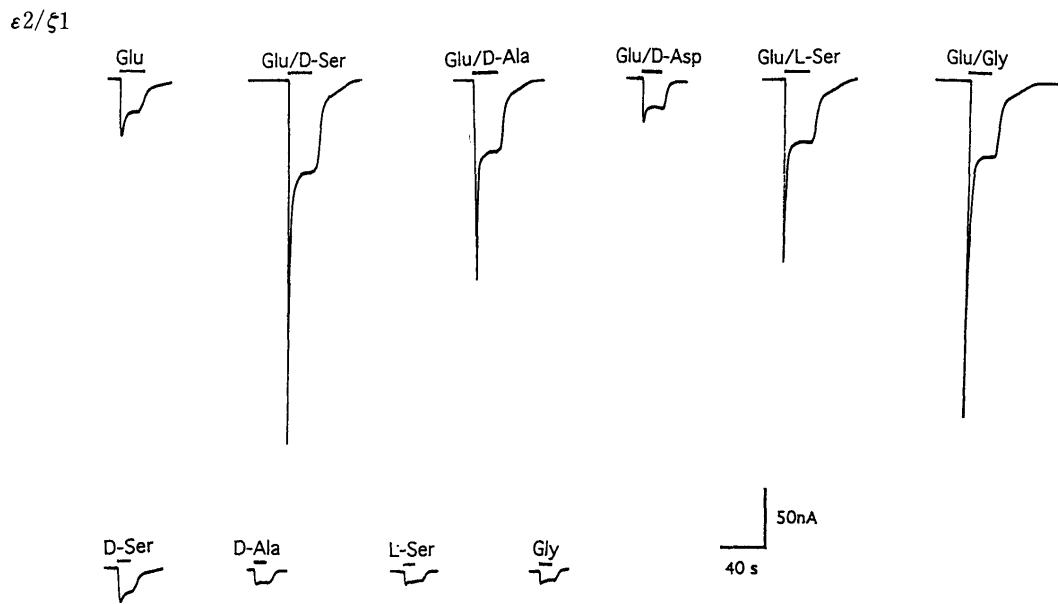


図1 $\epsilon 2/\xi 1$ NMDA 受容体チャンネルの各種アミノ酸単独または、同時投与に対する膜電流応答。電流応答は膜電位を -100 mV に固定し、各種アミノ酸 ($10 \mu\text{M}$) を 5 mM CaCl_2 含 FR 液中加入して測定。内向きの電流は下向きに示した。
Glu: グルタミン酸, D-, L-Ser: D-, L-セリン, D-Ala: D-アラニン, D-Asp: D-アスパラギン酸, Gly: グリシン。

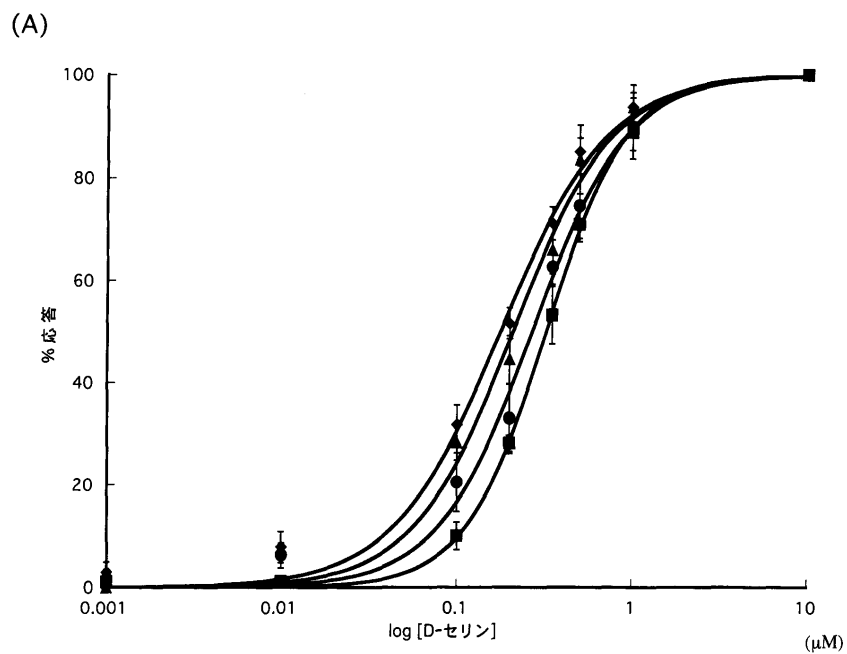


図2 A

(B)

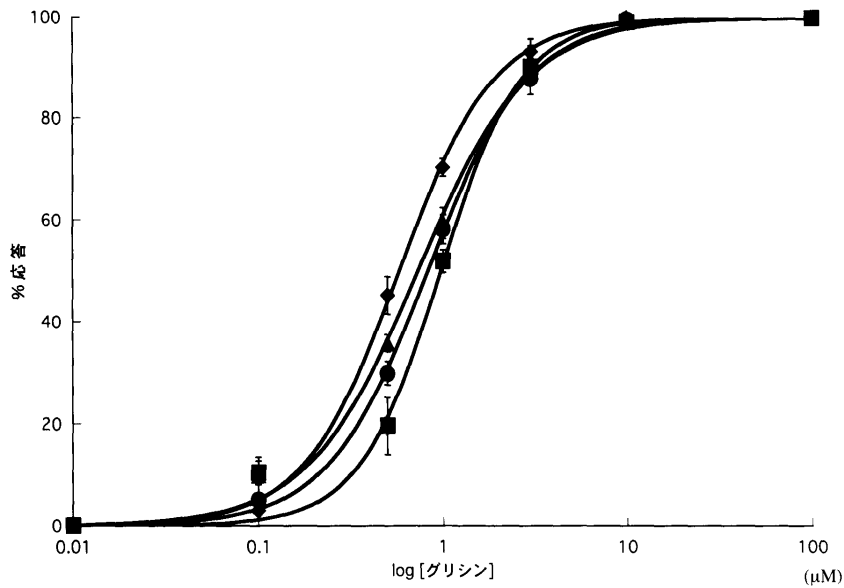


図 2 B

(C)

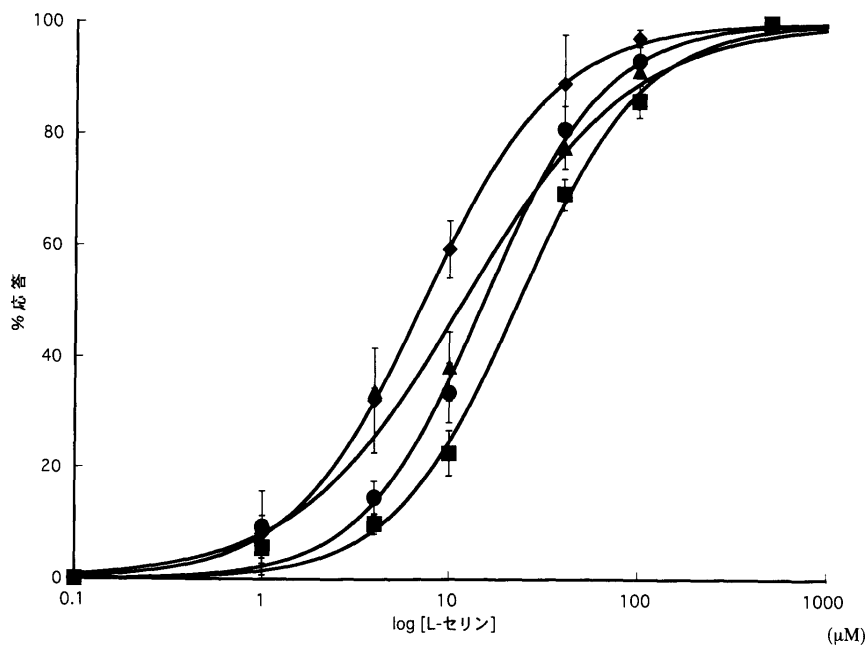


図 2 C

図 2 各種アミノ酸に対するクローン化 NMDA 受容体各チャンネルの薬理学的パラメータの検討
 D-セリン (A), グリシン (B), L-セリン (C) に対する濃度-応答曲線。
 $\epsilon 1/\xi 1$ (■), $\epsilon 2/\xi 1$ (●), $\epsilon 3/\xi 1$ (▲), $\epsilon 4/\xi 1$ (◆) 各チャンネルを発現させた卵母細胞 (8-12個) の電
 流応答を $10 \mu\text{M Glu}$ 存在下 5 mM CaCl_2 含 FR 液中で測定。
 膜電位は -100 mV に固定。
 曲線上の点は最高電流応答を 100% とした際の平均数値。標準誤差は縦棒で示した。濃度-応答曲線は次式を
 用いて算出した。

$$I = I_{\text{max}} / [1 + (\text{ED}50/A)^n]$$
 I: 電流応答, I_{max} : 最高電流応答, ED50: 反応が 50% に達したときの濃度, A: アゴニストの濃度, n: Hill
 係数。

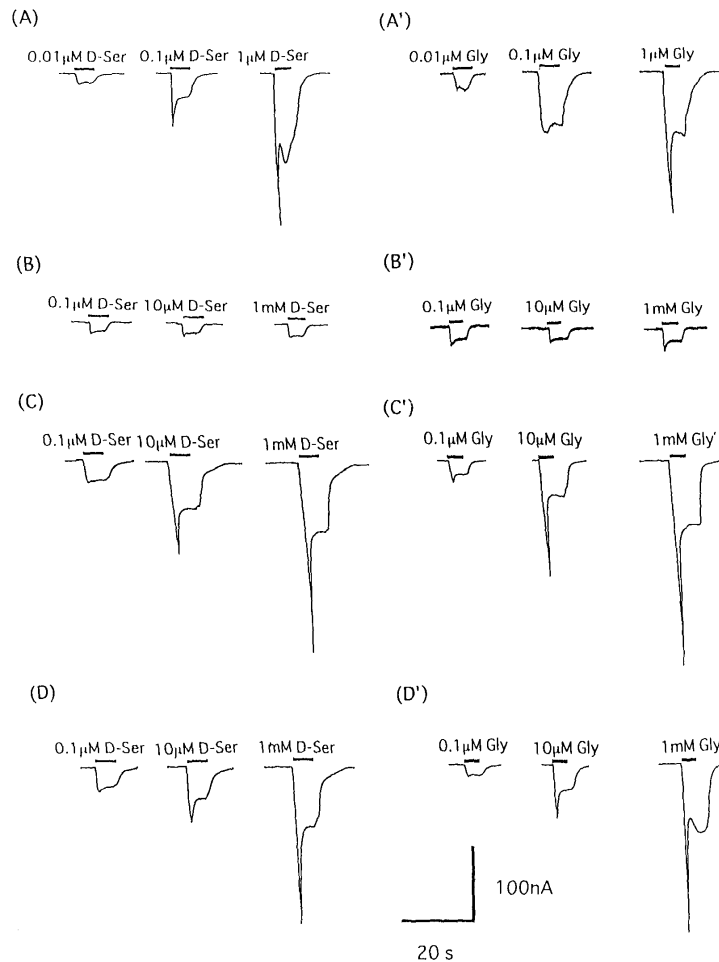


図3 野生型と点変異型 $\xi 1$ チャンネルのアゴニストに対する膜電流応答
 野生型 $\epsilon 2/\xi 1$ チャンネルの D-セリン (A) 及びグリシン (A') に対する電流応答。
 $\epsilon 2/Q387K\xi 1$ チャンネル (B, B'), $\epsilon 2/F390I\xi 1$ (C, C') チャンネル, $\epsilon 2/F466I\xi 1$ (D, D') チャンネルの
 D-セリン, グリシンに対する電流応答。
 電流応答は膜電位を -100 mV に固定し, アゴニスト ($10 \mu\text{M}$) を 5 mM CaCl_2 含 FR 液中加入して測定。内
 向きの電流は下向きの振れとして示した。

グリシンのアゴニスト活性増強作用に影響を与える事が解かった。それらのアミノ酸残基が D-セリンの場合においても影響があるかどうか調べるために、部位特異的突然変異法を用いてマウス $\xi 1$ サブユニットのアミノ酸配列中の相当するアミノ酸残基のいくつかを他のアミノ酸に置換し電気生理学的に検討した。個々の置換は $\xi 1$ サブユニットの N 末端側にある 387 番目のグルタミンをリジンに (Q387K $\xi 1$), 390 番目のフェニルアラニンをイソロイシンに (F390I $\xi 1$), また 466 番目のフェニルアラニンをヒスチジンに (F466I $\xi 1$) 換える点変異である。Q387K, F390I, F466H のそれぞれの $\xi 1$ チャンネルと野生

型の $\epsilon 2$ チャンネルの組み合わせにより形成される NMDA 受容体チャンネル ($\epsilon 2/Q387K\xi 1$, $\epsilon 2/F390I\xi 1$, $\epsilon 2/F466I\xi 1$) と野生型の $\epsilon 2/\xi 1$ チャンネルの D-セリンとグリシンに対する活性を比較した (図 3)。その結果, $\epsilon 2/F390I\xi 1$ の場合, D-セリンとグリシンに対する ED50 値はそれぞれ $139.0, 76.5 \mu\text{M}$ であった。また, $\epsilon 2/F466I\xi 1$ に関してもそれぞれ $87.6, 98.0 \mu\text{M}$ の値を示し, いずれの変異型チャンネルも野生型と比較して親和性は共に $100\text{--}500$ 倍低下していた (図 4)。 $\epsilon 2/Q387K\xi 1$ は D-セリン, グリシン共に 1 mM まで投与したがアゴニスト活性の増強は示さなかった (図 3 B, B')。

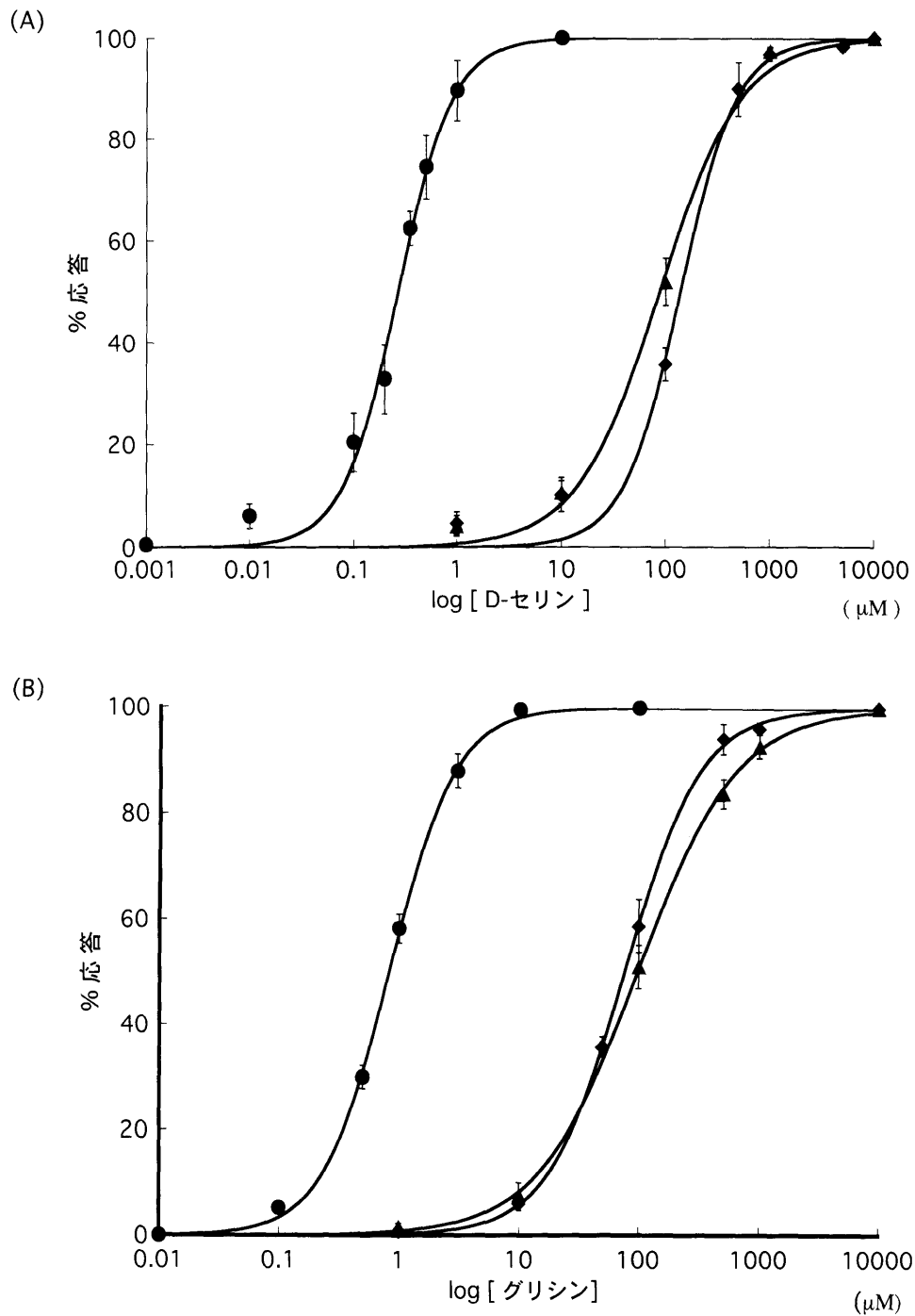


図4 変異 NMDA 受容体チャンネルのアゴニストに対する濃度-応答曲線
 $\epsilon 2 / F 3 9 0 I \xi 1$ (◆) チャンネル,
 $\epsilon 2 / F 4 6 6 I \xi 1$ (▲) チャンネルの D-セリン (A), グリシン (B) に対する濃度-応答曲線. 電流応答は膜電位を -100 mV に固定し, $10 \mu\text{M}$ Glu 存在下 5 mM CaCl_2 含 FR 液中で電流応答測定. コントロールの野生型 $\epsilon 2 / \xi 1$ (●) チャンネルは図 2 A, B から再掲載した. 濃度-応答曲線の算出法は図 2 に準じる.

考 察

以前から, いくつかの D-アミノ酸が NMDA 受容体チャンネル活性に影響を与えることが報告されて

いたが³⁻⁶, 哺乳類組織中に D-アミノ酸は存在しないと考えられていた². しかし最近になり, ヒトや齧歯類の脳内に D-セリン, D-アラニンや D-アスパラギン酸などの D-アミノ酸が存在することが報告さ

れた¹²⁻¹⁶。D-アスパラギン酸は、発生段階の一時期に高濃度に存在しているが、出生以降はほとんど検出されない¹³。D-アラニンに関しても脳には極く微量にしか存在していない^{24,25}。しかし、D-セリンは胎生期および出生以降も比較的安定して中枢神経系内に存在しており、その分布は大脳皮質、海馬、線状体などに多く、脊髄や末梢の組織には痕跡程度しか認められず、NMDA 受容体チャンネルの分布とも強い正の相関を示すことが報告された^{15,17,26}。これらのことは、内在性の D-アミノ酸がグリシン同様、NMDA 受容体の内在性調節物質である可能性を示唆していた。

本研究では、アフリカツメガエルの卵母細胞発現系を用いてクローン化された各 NMDA 受容体サブユニットに対する各種内在性 D-アミノ酸のアゴニスト活性増強作用を電気生理学的に検討した。

D-アスパラギン酸は、各 NMDA 受容体チャンネルに対してほとんど活性の変化を示さなかった。また、D-アラニンの存在も軽度の活性変化しかもたらさなかった。しかし、D-セリンは強い活性増強作用を示し、NMDA 受容体チャンネルの活性を増強させる唯一の内在性物質であるグリシンとほぼ等しかった。

D-セリン、グリシンの濃度-応答曲線から算出した ED50 値は、グリシンと比較して 3—4 倍 D-セリンの方が低く、D-セリンがグリシンと同等または、それ以上の内在性の NMDA 受容体活性調節物質であることが見いだされた。著者らは、以前脳内透析法を用いて同じ齧歯類であるラット脳内細胞外液の D-セリン、グリシンの濃度を報告した²⁷。前脳部においては、D-セリンの濃度は 6.5 μM とグリシン (7.0 μM) と同程度の濃度を示した。この濃度は今回示した D-セリンの濃度-応答曲線から、前脳部において D-セリンが NMDA 受容体活性を増強させるに十分な濃度であることを示している。D-セリンの鏡面異性体である L-セリンの脳内細胞外液の濃度は、D 体と比較して高値を示しているが²⁸、本研究で得られた L-セリンの ED50 値はこの濃度よりも高く、NMDA 受容体チャンネル活性への影響は少ないことが推察される。

$\zeta 1$ チャンネルの一塩基置換により、グリシンのアゴニスト活性増強作用に影響を与えるいくつかのアミノ酸が D-セリンにも重要な影響を与えることが見いだされた(図 4)。このことは、グリシンがそれぞれの NMDA 受容体チャンネルに結合する機序と同様の機序が D-セリンにも存在することが推測できる。

in vivo において、マウスの腹腔内に D-アミノ酸

を注射することにより、NMDA が引き起こす痙攣の閾値を低下させたり¹⁸、抗てんかん薬の作用を増強することが報告されていることから²⁹、D-アミノ酸はてんかん発作の作用機序を研究する上で重要な道具として用いられている。また、精神分裂病様症状を引き起こす phencyclidine (PCP) は NMDA 受容体反応を強力に遮断することが報告されており^{30,31}、この PCP に対して D-セリン、D-アラニン、または D-セリンの脂肪酸化合物がその作用を抑制することも示されている³²。これらのことから、D-アミノ酸が脳内で NMDA 受容体チャンネルを介して神経伝達に関与していることが推察される。特に D-セリンに関してはグリシンと同様 NMDA 受容体のアロステリック調節部位に作用する内在性調節物質の有力な候補の一つと考えられる。

しかし、D-セリンに関して未だ多くのことが解明されていない。特に、その生合成および、代謝経路については全く不明である。中性アミノ酸は、一般に血液脳関門の透過性が低い。さらに、D-体は L-体と比較して中枢移行性が劣る³³。また、血清中の D-セリンがきわめて低レベルであることなどの報告から³⁴、少なくとも D-セリンは脳内に存在する生成系酵素によって供給されていることが推測される。これらの代謝系を含めて、D-セリンひいては D 体のアミノ酸の中枢神経系における明確な位置づけについて今後の研究が期待される。

結 論

1) 内在性物質である D-セリン、D-アラニンは単独ではグリシン同様、各 NMDA 受容体チャンネルを軽度活性化した。しかし、同じ内在性物質である D-アスパラギン酸では NMDA 受容体チャンネルは活性化されなかった。

2) D-セリン、D-アラニンに L-グルタミン酸を加えることにより NMDA 受容体活性は増強した。L-セリンの作用は D-セリンに比べて著しく弱かった。

3) NMDA チャンネルの D-セリン、グリシンに対する親和性はともに、 $\epsilon 4/\zeta 1 > \epsilon 3/\zeta 1 > \epsilon 2/\zeta 1 > \epsilon 1/\zeta 1$ の順であった。D-セリンの ED50 値はそれぞれ 0.17 μM 、0.21 μM 、0.26 μM 、0.32 μM であり、またグリシンの ED50 値は 0.56 μM 、0.76 μM 、0.84 μM 、0.97 μM の順であった。

4) 部位特異的突然変異法を用いて $\zeta 1$ サブユニットのアミノ酸配列の N 末端側の 3 つのアミノ酸残基をそれぞれ他のアミノ酸に置換した。D-セリンに対する親和性は野生型に比べ 100 から 500 倍程度減少したため、これら 3 つのアミノ酸残基が D-セリンと

受容体との相互作用に重要な残基である可能性が示唆された。

5) 内在性D-アミノ酸の一つであるD-セリンはグリシン同様、またそれ以上にNMDA受容体の活性を増強させる物質であり、中枢神経機能に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲賜りました第3内科学堀内篤教授、神経内科科長高橋光雄助教授に深謝いたしますとともに、終始懇切なる御指導、御助言を賜った国立精神神経センター疾病第四部部长和田圭司先生、室長関口正幸先生に心より感謝いたします。また、本研究において絶大なる御協力を頂いた国立精神神経センター疾病第3部、第4部各位に感謝いたします。

本論文の要旨の一部は第18回日本神経科学大会(1994年12月東京)、第9回東京都臨床研国際カンファレンス(1994年11月東京)において発表した。

文 献

- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597-603
- Collingridge GL, Bliss TVP (1987) NMDA receptors-their role in long-term potentiation. *Trends Neurosci* 10: 288-293
- Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325: 529-531
- Fadda E, Danysz W, Wroblewski JT, Costa E (1988) Glycine and D-Serine increase the affinity of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate binding sites in rat brain synaptic membranes. *Neuropharmacology* 27: 1183-1185
- Kleckner NW, Dingledine R (1989) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* Oocytes. *Science* 241: 835-837
- Salt TE (1989) Modulation of NMDA receptor-mediated responses by glycine and D-serine in the rat thalamus in vivo. *Brain Res* 481: 403-406
- McDonald JW, Johnston MV (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Rev* 15: 41-70
- Olney JW (1990) Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108
- Choi DW (1992) Bench to bedside: the glutamate connection. *Science* 258: 241-243
- Kemp JA, Leeson PD (1993) The glycine site of the NMDA receptor-five years on. *Trends Pharmacol Sci* 14: 20-25
- Corrigan JJ (1969) D-Amino acid in animals. *Science* 164: 142-149
- Man EH, Sandhouse ME, Burg J, Fisher GH (1983) Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain. *Science* 220: 1407-1408
- Dunlop DS, Neidle A, McHale D, Dunlop DM, Lajtha A (1986) The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochem Biophys Res Commun* 141: 27-32
- Fisher GH, Garcia NH, Payan IL, Cadilla-Perezrrios R, Sheremata WA, Man EH (1986) D-Aspartic acid in purified myelin and myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 683-687
- Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett* 296: 33-36
- Nagata Y, Yamamoto K, Shimojo T, Konno R, Tasumura Y, Akino T (1992) The presence of free D-alanine, D-proline and D-serine in mice. *Biochim Biophys Acta* 1115: 208-211
- Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K (1993) Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D aspartate receptor-related distribution and aging. *J Neurochem* 60: 783-786
- Singh L, Oles RJ, Tricklebank MD (1990) Modulation of seizure susceptibility in the mouse by the strychnine-insensitive glycine recognition site of the NMDA receptor/ion channel complex. *Br J Pharmacol* 99: 285-288
- Kuryatov A, Loube B, Betz H, Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12: 1291-1300
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-37
- Sekiguchi M, Doi K, Zuh W, Watase K, Yokotani N, Wada K, Wenthold JR (1994) A deletion in the second cytoplasmic loop of GluR3 produces a dominant negative mutant of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor. *J Biol Chem* 269: 14559-14565
- Kunkel TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotype selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 488-492
- Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, Mishina M (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358: 36-41
- Fisher GH, D'Aniello A, Vetere A (1991) Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain. *Brain Res Bull* 26: 983-985
- Nagata Y, Akino T, Ohno K (1989) Presence of free D-amino acids in mouse tissues. *Experientia* 45: 330-332
- Hashimoto A, Kumashiro S, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Mito T, Takashima S, Doi N, Mizutani Y, Yamazaki T, Kaneko T, Ootomo E (1993) Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J Neurochem* 61: 348-351
- Matsui TK, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U,

- Nishikawa T, Wada K. (1995) Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J Neurochem* 65: 454-458
28. Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T (1995) Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by in vivo microdialysis. *Neuroscience* 66: 635-643
29. Peterson SL (1991) Anticonvulsant drug potentiation by glycine in maximal electroshock seizure is mimicked by D-serine and antagonized by 7-chlorokynurenic acid. *Eur J Pharmacol* 199: 341-348
30. Javitt DC, Zukin SR (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148: 1301-1308
31. 西川 徹, 橋本篤司, 谷井靖之(1992) フェンサイクリジンの脳に対する作用—興奮性アミノ酸伝達遮断作用を中心として—. *精神医学* 34: 891-900
32. 橋本篤司, 西川 徹(1994) フェンサイクリジン投与動物を用いた精神分裂病の研究. *脳と精神の医学* 5: 47-57
33. Smith QR, Momma S, Aoyagi M (1987) Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 49: 1651-1658
34. Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Hayashi T (1992) Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert-butylloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthalaldehyde. *J Chromatogr* 582: 41-48