

幼若ラット視覚野のシナプス可塑性における 代謝型グルタミン酸受容体の役割

春田 博之

近畿大学医学部第3内科学教室

A Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Synaptic Plasticity in the Visual Cortex of Young Rats

Hiroyuki Haruta

Third Department of Internal Medicine, Kinki University
School of Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

Long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), often used as essential components in synaptic models of learning, memory and forgetting, can be produced in cortical tissue by repetitive tissue by repetitive activation of neural pathways under different stimulus conditions. To examine whether metabotropic glutamate receptors (mGluRs) play a role in the induction of LTP and/or LTD, an antagonist of mGluRs, (RS)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG), was administered to visual cortical slices obtained from young rats (20-30 days postnatal).

MCPG blocked LTD, but was ineffective against the induction of LTP in most of slices tested. These results suggest the critical involvement of mGluRs in producing LTD but not LTP in the visual cortex.

Key words: Long-term potentiation, Long-term depression, Metabotropic glutamate receptors, (RS)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine, Synaptic plasticity, Visual cortex, Rat

緒 言

海馬や大脳新皮質のシナプスは、高頻度あるいは特定のパターンの入力によってその伝達効率を長期持続的に増強あるいは抑圧することが知られている^{1,2}。このシナプス長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) は、海馬においては学習や記憶、あるいは忘却のメカニズムに関係しているとされ、新皮質視覚野においては皮質機能の適応的变化に関与していると考えられている²⁻³。これらのシナプス可塑性には N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型のグルタミン酸受容体が重要であることが知られていたが^{1,2} 最近になって代謝型グルタミン酸受容体 (mGluRs) の

関与がその作動薬や非選択的な拮抗薬を使った実験で示唆された^{4,5}。さらに最近 mGluRs と関連した G 蛋白質の阻害薬を使った実験からも mGluRs の関与が示唆された^{6,7}。しかしながら、これらの拮抗薬及び阻害薬は選択性に乏しいため代謝型グルタミン酸受容体の関与をより直接的に証明することは困難であった。しかるに最近、代謝型グルタミン酸受容体にたいする選択的拮抗薬として (RS)- α -methyl-4-carboxy phenylglycine (MCPG) が報告された⁸⁻¹¹。そこで本研究では、この拮抗薬を用いてシナプス長期増強および長期抑圧の誘発に代謝型グルタミン酸受容体が関与しているかどうかを幼若ラット視覚野切片標本にて検討した。

方法

生後20日～30日齢の Sprague-Dawley ラットを 1.3 g/kg のウレタンで麻酔後、従来の方法¹² に従っ

て視覚野を切り出し冠状切断により500 μ m の切片標本を作成した (Fig. 1Aa). 切片標本は容量 2 cc の灌流槽に置き、95% O₂/5% CO₂ で飽和した人工脳脊髄液 (NaCl, 124 ; KCl, 5 ; KH₂PO₄, 1.2 ; MgSO₄,

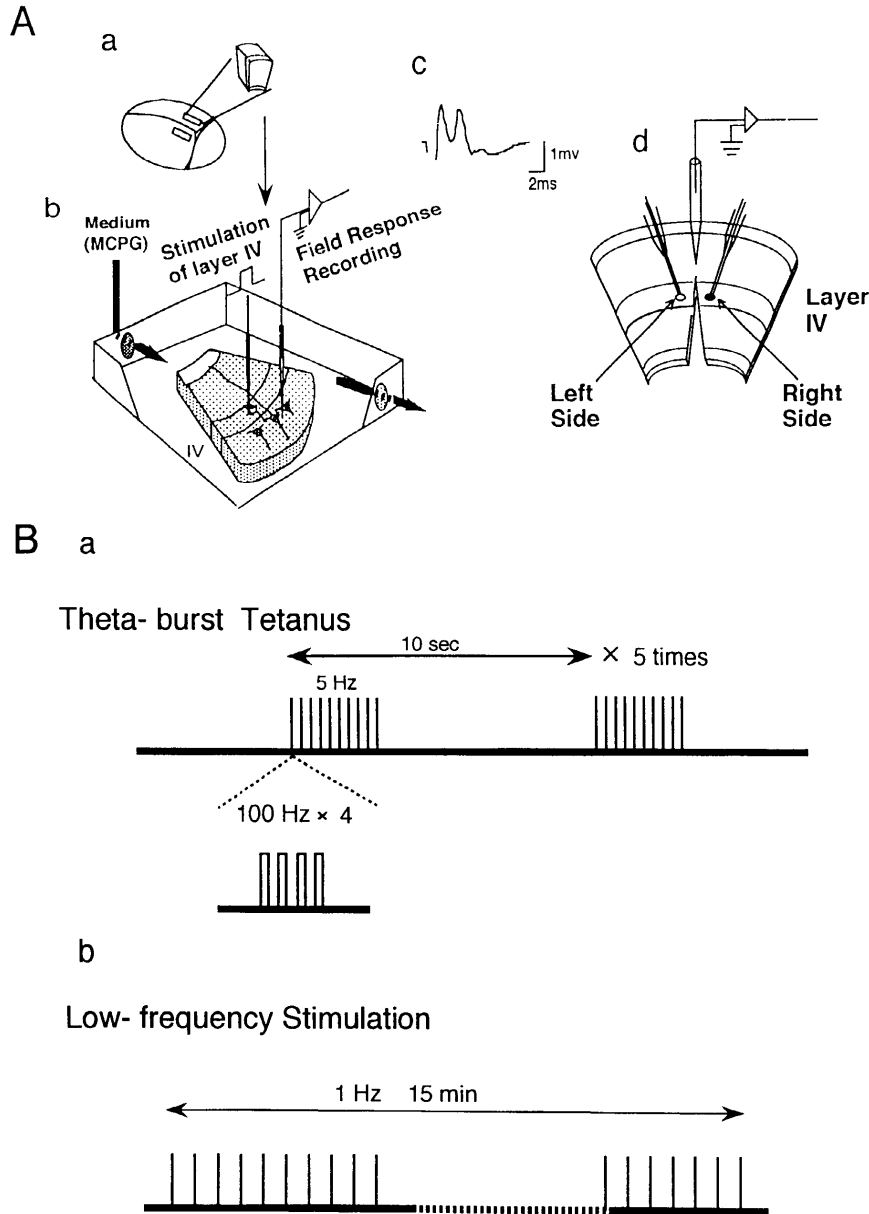


Fig. 1 A; Schema showing an arrangement of stimulating, recording and electrodes in slices and two protocols for electrical activation of afferent pathways within the slice. a; Coronal slices of the primary visual cortex were separated from Sprague-Dawley rats (20-30 days post natal). b; Each visual cortical slice was perfused with the medium which was saturated with gas (95%O₂/5%CO₂) and maintained at 31°C.

The composition of the medium was (in mM) : NaCl, 124; KCl, 5; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄, 1.3; CaCl₂, 2.4; NaHCO₃, 26; Glucose 10. A bipolar stimulating electrode was placed in layer IV of the cortex and a glass micropipette filled with 0.5 M sodium acetate containing 2% pontamine sky blue (resistance < 10 M Ω) was inserted into layer II/III of the cortex to record field potentials.

d; A cortical slice was transected to confirm that the induction of LTD was input-specific. LFS was given to left side of layer IV and test stimulation given to the right side. B; two types of stimulation protocol. a. High frequency pulse train (4 pulses at 100 Hz) given at the θ -rhythm (5 Hz) for 2 sec and repeated 5 times at 10 sec intervals (θ -burst tetanus). b. Low frequency stimulation at 1 Hz for 15 min (LFS).

1.3 ; CaCl₂, 2.4 ; NaHCO₃, 26 ; Glucose, 10以上単位 mM) を 2ml/min の速度で灌流した。温度設定は31°Cとした。この状態で切片の皮質第IV層にガラス被覆タングステンの双極刺激電極、II/III層に0.5 M の酢酸ナトリウムを満たした微小ガラス管記録電極を設置し、0.1 Hz の試験刺激をIV層に与えそれに対するII/III層の反応を少なくとも10分間観察し

コントロールとした。その試験刺激の強度はシナプス後集合電位が出現する閾値の1.5倍で行った (Fig. 1Ab)。

Figure 1Aa 右上にシナプス後集合電位の一例を示す。最初の上向き波 (陰性波) は興奮の逆行性伝播による反応で2番目の陰性波がシナプス後成分を示している。このことは灌流液を Ca²⁺ free にする

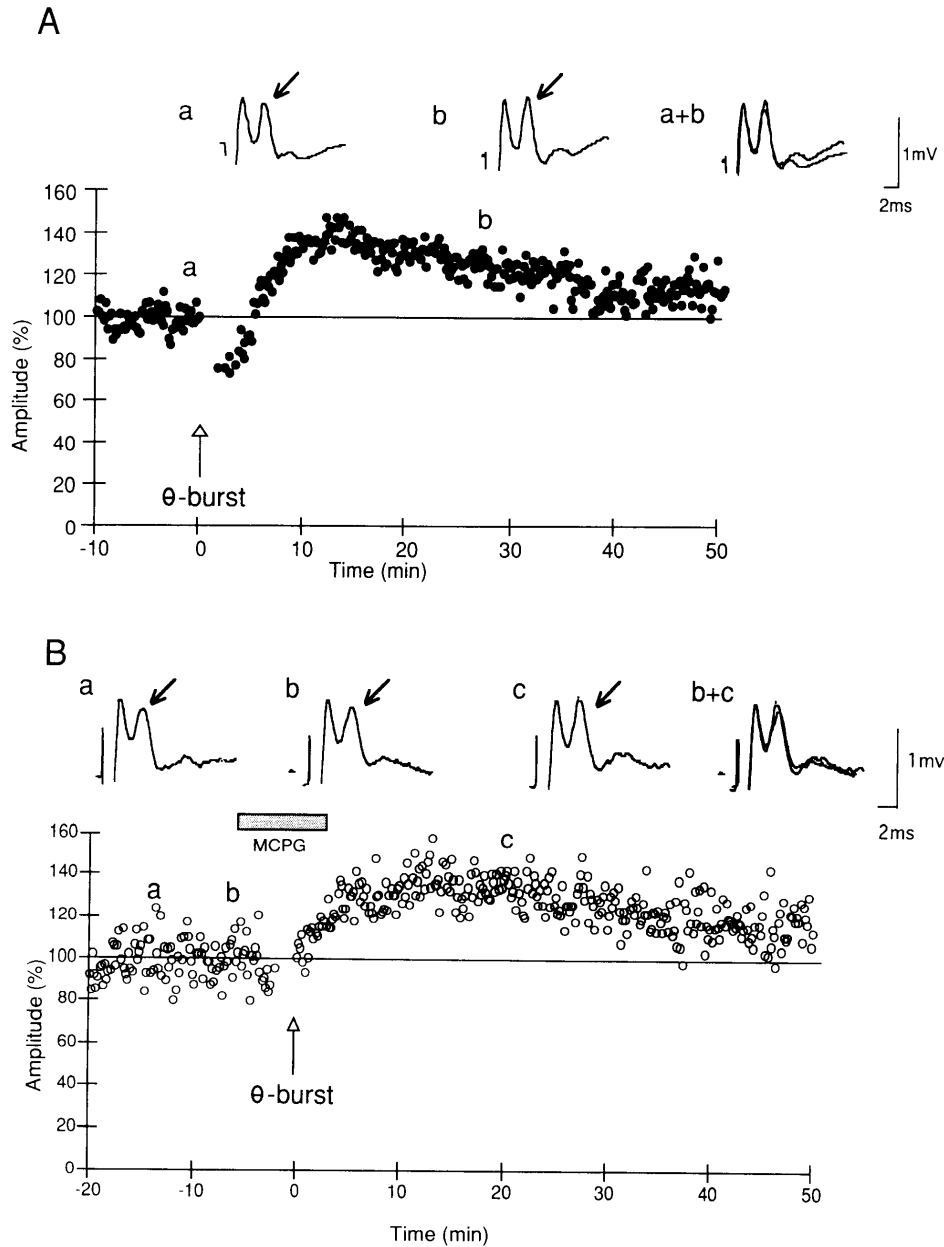


Fig. 2 Induction of LTP and the absence of blocking action by MCPG.

A: The lower graph shows time courses in the amplitude of the field response to layer II/IV to test stimulation of layer IV. Examples of records obtained at the time points indicated by a and b are shown at the top. The arrows indicate postsynaptic responses, whose peak-to-peak amplitudes were measured.

B: Ineffectiveness of MCPG on LTP induction. The lower graph shows the time course of the amplitude of field responses in layers II/III to test stimulation in layer IV. Examples of records obtained at the time points indicated by a, b and c are shown at the top. MCPG was administered to a slice for 10 min, as indicated by the horizontal line in the graph.

と2番目の電位が消失することにより確認した。振幅の計測はこのシナプス後成分の立ち上がりから頂点まで (peak to peak) で行った。

伝達効率の変化を起こすためIV層の条件刺激は2通りの方法で行った¹³⁻¹⁵。一つは長期増強を起こすことが知られている100 Hz, 4発のパルスを θ リズム (5 Hz) で2秒間与えそれを10秒間隔で5回繰り返すという高頻度刺激 (以下 θ -burst tetanus と呼ぶ) である (Fig. 1Ba)。もう一つは長期抑圧を起こすことが知られている, 1 Hz 15分間の低頻度刺激 (low frequency stimulation: 以下 LFS と呼ぶ) である (Fig. 1Bb)。これらの試験刺激の前には先に述べた様に試験刺激を与えその反応を少なくとも10分間観察しコントロールとした。

θ -burst tetanus あるいは LFS の後には少なくとも30分間コントロールと同じ強度の刺激を0.1 Hz で与えシナプス伝達効率の長期的変化の有無を観察した。

なおシナプス長期抑圧の観察には, その抑圧が切片標本や記録条件の悪化によるものではないことを確認する必要があった。そのため LFS による長期

抑圧を観察する際には切片標本の白質からIII層底部にまで切れめをいれIV層を左右別々に交互に試験刺激する方法をとった (Fig. 1Ad)。その後一方にだけ LFS を加え, 他方の試験刺激に対する反応はコントロールとした。

成 績

最初にカルシウムイメージング法¹⁸を用いて今回使用する500 μ M の MCPG がラットの視覚野切片標本において代謝型グルタミン酸受容体の作用を阻止すること¹⁷を確認した後, θ -burst tetanus によって生じる長期増強に対する MCPG の影響を検討した。

Figure 2A は MCPG のない正常灌流液のまま θ -burst tetanus をIV層に与え II/III層の集合電位の高化を観察した10枚の標本のうちの一例である。上段のシナプス後集合電位波形の計測は先に述べた方法で2番目の陰性波の振幅を peak to peak で行った。下段にはその振幅の変化の時間経過を示している。 θ -burst tetanus を与える前, 10分間の試験刺激に対する値をコントロールとし, その百分率で示

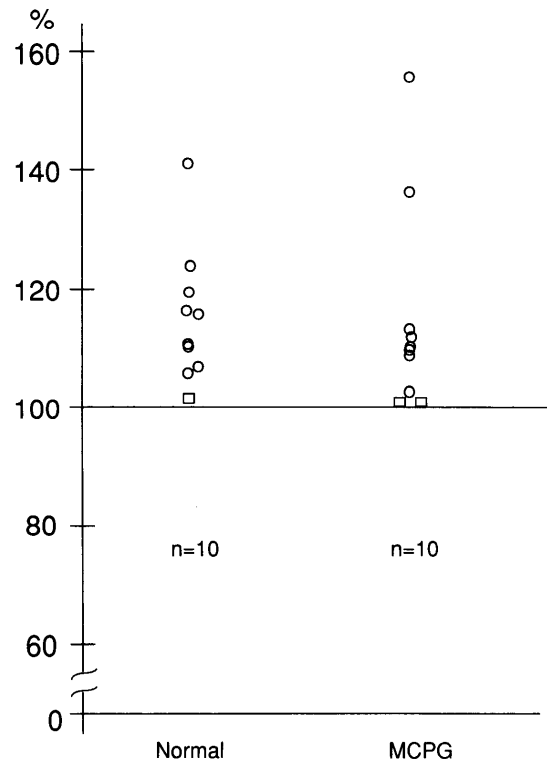


Fig. 3 Ratio of the mean amplitudes of postsynaptic responses after θ -burst tetanus to those before the tetanus. The latter values are the averages of 30 responses recorded just before θ -burst tetanus and shown here as normalized values (horizontal line). The former values are the averages of 30 responses recorded 25-30 min after cessation of the θ -burst tetanus. In the second column the data were obtained from slices to which MCPG was administered for 10 min. The mean values for θ -burst tetanus without and with MCPG ($n=10$ for each) were 115 ± 12 (S.D) % and 115 ± 19 % respectively. Circles and squares represent slices in which post tetanic values were significantly (t -test, $p < 0.01$) different and not different from the pretetanic values, respectively.

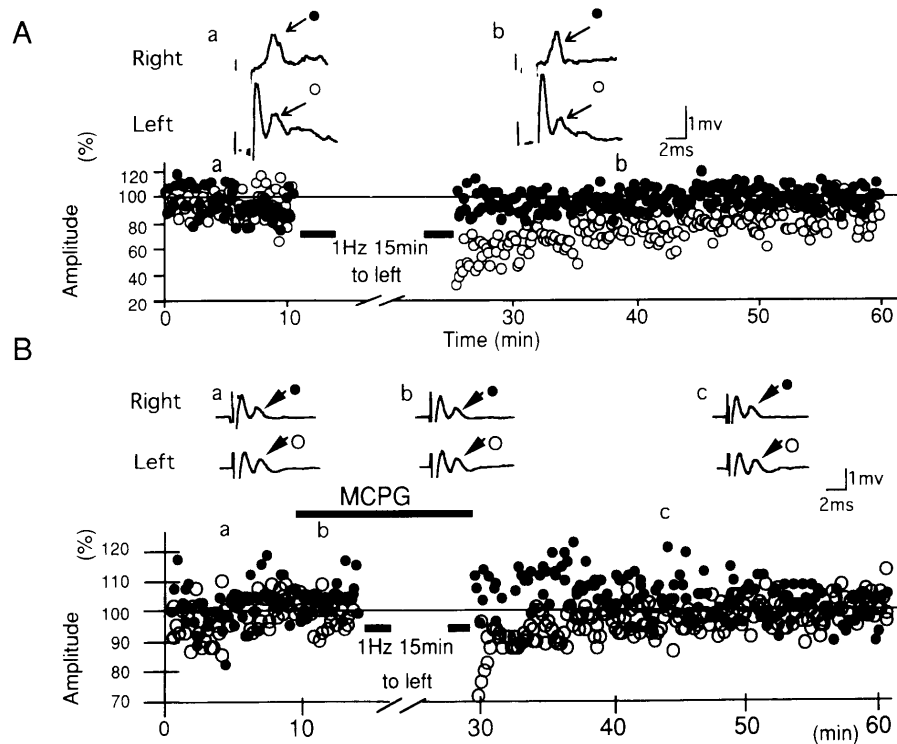


Fig. 4 Input-specific induction of LTD and its blockade by MCPG.

A : Induction of LTD. The lower graph shows the time courses of the amplitudes of the field responses to test stimulation of left (open circles) and right (filled circles) sides in layer IV. LFS was given to left side, as indicated in the graph. Examples of records obtained at the time points indicated by a and b are shown at top. Arrows with filled and open circles indicate postsynaptic responses whose amplitudes were measured.

B : Blockade of LTD induction by MCPG. Conventions are the same as in A. MCPG was administered to slices for 20 min, as indicated by the horizontal line.

してある。θ-burst tetanus を与えた後、シナプス後電位は振幅が増大し10~15分でピークに達しその後徐々に低下はしているが30分で一定の状態に達している。それ以降もコントロール値より大きくなったままである (Fig. 2A)。

次に、500 μM の MCPG が II/III 層の集合電位反応に与える影響を調べた。観察した10枚の標本のうち1枚においてのみシナプス後成分のわずかな低下(約10%)が見られたが、残りの9枚では影響は見られなかった。さらに500 μM の MCPG 投与中に θ-burst tetanus を IV 層に与えたところ II/III 層の集合電位の反応は正常灌流液と同様に大きくなった (Fig. 2B)。以上の結果を θ-burst tetanus 前5分と後25~30分の振幅の値で比較したところ t-検定 1% のレベルで有意に長期増強が誘発されたのは正常灌流液では10枚の切片のうち9枚、MCPG 投与群では10枚のうち8枚であった (Fig. 3)。

次にシナプス長期抑制の誘発に MCPG がどのような作用を及ぼすかを調べた。IV層に LFS を与えると II/III 層で高率にシナプス長期抑圧が誘発され

ることがすでに報告されている¹³⁾。しかし、集合電位振幅の低下は切片標本や記録の状態が悪化したためである可能性がある。この可能性をチェックするために白質から記録部位 II/III 層直下まで切れ目をいれた切片標本を使用した (Fig. 1Ab)。その記録の一例を Figure 4A に示す。この場合右側には終始、試験刺激を与えその反応をコントロールとし、左側には10分間の試験刺激の後 LFS を与えその後の変化を観察した。上段はその時の波形で計測は先に述べたと同様にシナプス後成分の振幅を peak to peak で行った。下段はその時の時間経過で LFS 後、左側の刺激にたいするシナプス後成分の振幅は有意に低下しその抑圧はその後30分以上持続することが観察された。右側の刺激にたいしては刺激前後に有意な変化を認めなかった。したがって、この実験の間、切片の状態および記録状態は安定していたと言える。

正常灌流液中では、LFS 前5分に対し LFS 後25~30分の振幅の値が有意に (t-検定 1% のレベル) 小さいという長期抑圧が実験をした10枚の切片

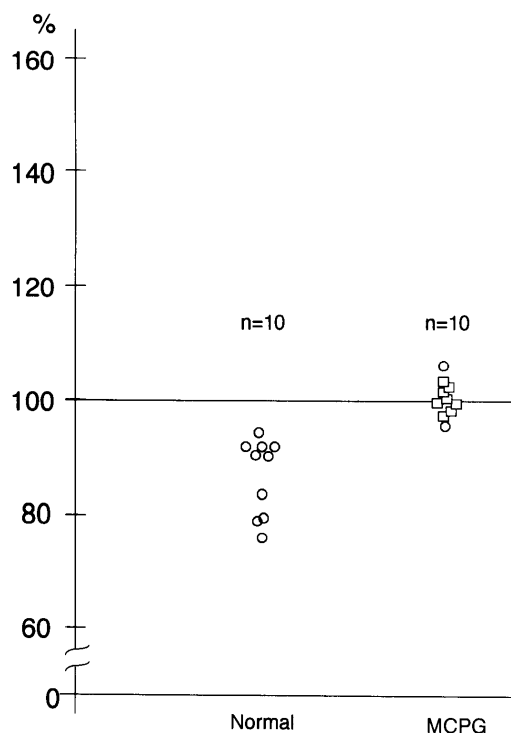


Fig. 5 Ratio of the mean amplitudes of post-synaptic responses after LFS to those before LFS. The latter values are the averages of 30 responses recorded just before LFS and shown here as normalized values (horizontal line). The former values are the averages of 30 responses recorded 25–30 min after cessation of LFS. In the second column, the data were obtained from slices to which MCPG was administered for 20 min. The mean values for LFS without and with MCPG ($n=10$ for each) were 87 ± 6.8 and $100 \pm 3.3\%$ respectively. Circles and squares represent slices in which post LFS are significantly (t -test, $p < 0.01$) different and not different from pre LFS values, respectively.

の全てにみられた (Fig. 5-Normal) 次に高頻度刺激の場合と同様にして灌流液から $500 \mu\text{M}$ の MCPG を LFS 5 分前から LFS 終了までの計 20 分間投与し変化をみた。その時の一例が Figure 4B で MCPG の投与中 LFS を与えても長期抑圧は誘発されていない。この実験をした 10 例のうち 8 例では t -検定 1% のレベルで長期抑圧は誘発されなかった (Fig. 5-MCPG)。しかし、この結果は切片標本の違いによる可能性もあるので、同一切片において MCPG の有無による長期抑圧の誘発との関係を 3 例において調べた。この 3 例全てにおいて MCPG 投与中には長期抑圧は誘発されなかったが、MCPG wash out 40 分後再び LFS を与えたところ、長期抑圧が誘発されるようになった。

考 察

本実験はラット視覚野切片標本において主に次の点を明かにした。1) MCPG は $500 \mu\text{M}$ の濃度で mGluR に拮抗すること、及び 2) mGluR を抑えると長期抑圧は阻止されるが長期増強は阻止されないことである。この 1) の結果は最近のラットの海馬やチャイニーズハムスターの卵母細胞での報告^{8,9,19,20} と一致しているように見える。一方 2) の結果は海馬 CA1 領域における長期増強は MCPG によって阻止されるとの報告⁸ と必ずしも一致しない。したがって、長期増強の誘発における代謝型グルタミン受容体の役割は海馬と視覚野で異なるかもしれない⁷。ただしごく最近、海馬 CA1 領域においても θ -burst tetanus による長期増強は MCPG によって影響を受けないが 100 Hz, 1 秒間の高頻度刺激による長期増強は阻止されるとの報告がなされた²⁷。したがって視覚野でも燐激パターンによっては長期増強が阻止される可能性もあり今後検討する必要がある。代謝型グルタミン受容体の subtype のうち mGluR1 と 5 はイノシトール三リン酸を介して細胞内 Ca^{2+} からの Ca^{2+} 放出を起こすことが知られている^{20,28}。一方、NMDA 受容体の活性化はシナプス後部への Ca^{2+} 流入を引き起こすと考えられている^{1,2} (Fig. 6)。この時の Ca^{2+} 増加の程度がシナプス可塑性の方向、すなわち長期増強となるかあるいは長期抑圧となるか、を決める因子とする仮説がある^{3,29,30}。すなわち θ -burst tetanus によって大量の Ca^{2+} 流入がおり、ある閾値を越えると長期増強を誘発するが、細胞内 Ca^{2+} の増加が比較的小さい場合には長期抑圧を誘発すると考える^{3,15,31–33}。今回の実験では LFS により長期抑圧が誘発されたが、MCPG を使い代謝型グルタミン受容体を阻止した状態では誘発されなかった。さらに海馬培養細胞において、代謝型グルタミン受容体賦活による Ca^{2+} 増加は NMDA 受容体賦活による増加よりもはるかに少ないという報告がある³⁴。したがって、LFS では NMDA 受容体や電位依存性 Ca^{2+} チャネルが賦活されず代謝型グルタミン受容体のみが賦活され Ca^{2+} の増加は比較的低濃度で、そのため長期抑圧が誘発されたと考えられる。一方 θ -burst tetanus では代謝型グルタミン受容体を阻止しても NMDA 受容体を介した大量の Ca^{2+} が流入し長期増強を誘発したと考えられる。

mGluR の subtype は Nakanishi らにより 1~7 までその存在が知られており、1 と 5 はイノシトール三リン酸を賦活しその他の subtype は cAMP 系を抑制することが知られている^{20,28,38–42}。この subtype

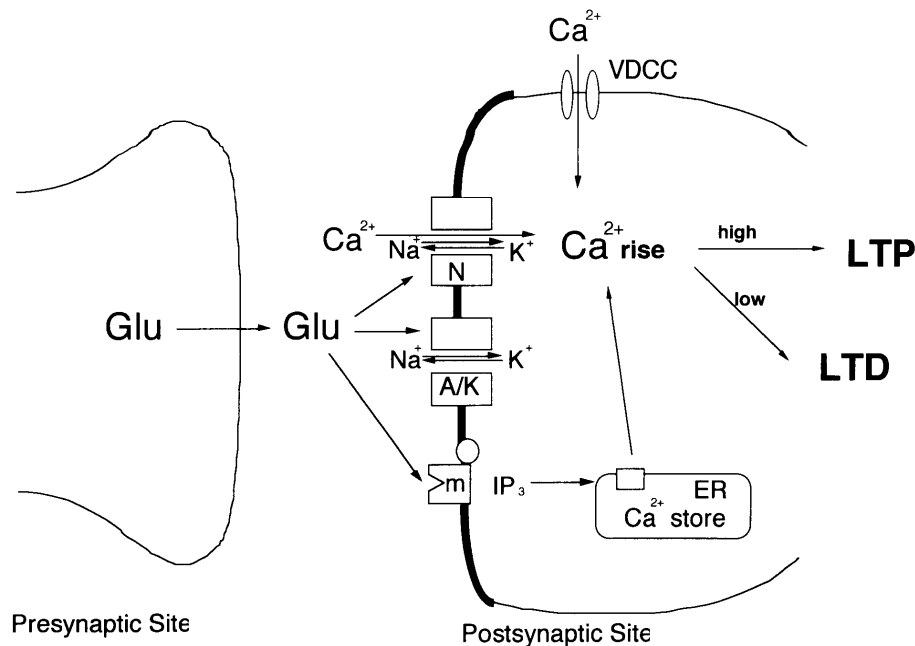


Fig. 6 The mechanism of tetanus-induced increase in postsynaptic Ca^{2+} .

N: NMDA receptor, A/K: AMPA/KA receptor m: mGluR, Glu: glutamic acid, ER: endoplasmic reticulum, IP₃: Inositol 1,4,5-triphosphate UDCC: voltage-dependent calcium channel

の中で1と5, はラットの大脳皮質に多く存在し, さらに主にシナプス後部に分布していることが明らかになっている^{35,36}. 一方その他の subtype, 特に mGluR2 はシナプス前部よりのグルタミン酸放出を抑制していることが示唆されている³⁷. 本研究で使用した MCPG はこの subtype の全てに作用し得るが²⁰, 以上の述べてきた知見より, ラット視覚野において MCPG は mGluR5 あるいは1 に主に作用して長期抑圧を阻止したものと考えられる.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲賜りました, 第3内科堀内篤教授, 神経内科科長高橋光雄助教授に深謝しますとともに, 終始懇切なる御指導, 御助言を賜った大阪大学医学部神経生理学津本忠治教授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, ノースカロライナ大学 T. P. Hicks 教授, 大阪大学医学部神経内科高橋正紀先生, 船内正裕先生, 同大学神経生理上下智之先生に感謝いたします.

本論文の要旨の一部は第17回日本神経科学大会 (1993年12月名古屋) において発表した.

文 献

- Bliss TPV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31-39.
- Tsumoto T. Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex. *Prog Neurobiol* 1992; 39: 209-228.
- Tsumoto T. Long-term depression in cerebral cortex: A possible substrate of forgetting that should not be forgotten. *Neurosci Res* 1993; 16: 263-270.
- Zheng F, Gallagher JP. Metabotropic glutamate receptors are required for the induction of long-term potentiation. *Neuron* 1992; 9: 163-172.
- Ito I, Sugiyama H. Roles of glutamate receptors in long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses. *NeuroReport* 1991; 12: 333-336.
- Kato N. Dependence of long-term depression on postsynaptic metabotropic glutamate receptors in visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3650-3654.
- Masu M, Tanabe Y, Nakanishi S. Sequence and expression of metabotropic glutamate receptor. *Nature* 1991; 349: 760-765.
- Bashir ZI, Watkins JC, Collingridge GL. Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* 1993; 363: 347-350.
- Bashir ZI, Jane DE, Sunter DC, Watkins JC, Collingridge GL. Metabotropic glutamate receptors contribute to induction of long-term depression in the CA₁ region of the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 1993; 239: 265-266.
- Eaton SA, Watkins JC, Salt TE. Mediation of thalamic sensory responses *in vivo* by ACPD-activated excitatory amino acid receptors. *Eur J Neuro Sci* 1993; 5: 186-189.
- Birse EF, Eaton SA, Watkins JC. Phenyl glycine derivatives as neY pharmacological tools for investigating the role of metabotropic glutamate receptors in the

- central nervous system. *Nuerosci* 1993; 611: 81-86.
12. Kimura F, Nishigori A, Shirokawa T, Tsumoto T. Long-term potentiation and N-methyl-D-aspartate receptors in the visual cortex of young rats. *J Physiol* 1989; 414: 125-144.
 13. Kirkwood A, Dudek SM, Gold JT, Aizenman CD, Bear MF. Common forms of synaptotaxin plasticity in hippocampus and neocortex in vitro. *Science* 1993; 260: 1518-1521.
 14. Fujii S, Saito K, Miyakawa H, Ito K, Kato H. Reversal of long-term potentiation (depotentiation) induced by tetanic stimulation of the input to CA₁ neurons of guinea pig hippocampal slices. *Brain Res* 1991; 555: 112-122.
 15. Mulkey RM, Malenka RC. Mechanism underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA₁ of the hippocampus. *Neuron* 1992; 91: 967-975.
 16. Dudek SM, Bear MF. Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J Neurosci* 1993; 13: 2910-2918.
 17. Eaton SA, Salt TE, Watkins JC. Competitive antagonism at metabotropic glutamate receptors by (S)-4-carboxy phenylglycine and (RS)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine. *Eur J Pharmacol* 1993; 244: 195-197.
 18. Takahashi MP, Sugiyama M, Tsumoto T. Laminar difference in tetanus-induced increase of intracellular Ca²⁺ in visual cortex of young rats. *Neurosci Res* 1993; 17: 217-228.
 19. Bolshakov VY, Siegelbaum SA. Postsynaptic induction and presynaptic expression of hippocampal long-term depression. *Science* 1994; 264: 1148-1152.
 20. Hayashi Y, Sekiyama N, Nakanishi S, Watkins JC. Analysis of agonist and antagonist activities of phenylglycine derivatives for different cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *J Neurosci* 1994; 14: 3370-3377.
 21. Enkvist MOK, Holopainen I, Akerman KEO. Glutamate receptor-linked changes in membrane potential and intracellular Ca²⁺ in primary rat astrocytes. *Glia* 1987; 2: 397-402.
 22. Evans RH, Francis AH, Watkins JC. The effects of series of ω -phosphonic- α -carboxylic amino acids on electrically evoked and amino acid induced response in isolated spinal cord preparations. *Br J Pharmacol* 1982; 75: 65-75.
 23. Furuya S, Ohmori H, Shigemoto T, Sugiyama H. Intracellular calcium mobilization triggered by a glutamate receptor in rat cultured hippocampal cells. *J Physiol* 1989; 414: 593-548.
 24. Glaum SR, Holzwarth JA, Miller RJ. Glutamate receptors activate the mobilization and Ca²⁺ influx into astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3454-3458.
 25. Murphy SN, Miller RJ. A glutamate receptor regulates Ca²⁺ mobilization in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8737-8741.
 26. Murphy SN, Miller RJ. Two distinct quisqualate receptors regulate Ca²⁺ homeostasis in hippocampal neurons in vitro. *Pharmacology* 1989; 35: 671-680.
 27. Brown RE, Rabe H, Reymann KG. (RS)- α -ethyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) does not block θ burst-induced long-term potentiation in area CA₁ of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 1994; 170: 17-21.
 28. Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992; 258: 597-603.
 29. Lisman J. A mechanism for the Hebb and anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9574-9578.
 30. Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA₁ of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4363-4367.
 31. Artola A, Brocher S, Singer W. Different voltage dependent thresholds for inducing long-term depression and long-term potentiation in slices of rat visual cortex. *Nature* 1990; 347: 69-72.
 32. Brocher S, Artola A, Singer W. Intracellular injection of Ca²⁺ chelators blocks induction of long-term depression in rat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 123-127.
 33. Kimura F, Tsumoto T, Nishigori A, Yoshimura Y. Long-term depression but not potentiation is induced in Ca²⁺ chelated visual cortical neurons. *NeuroReport* 1990; 1: 65-68.
 34. Furuya S, Ohmori H, Shigemoto T, Sugiyama H. Intracellular calcium mobilization triggered by a glutamate receptor in rat cultured hippocampal cells. *J Physiol* 1989; 41: 359-548.
 35. Martin LJ, Blackstone CD, Huganir RL, Price DL. Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* 1992; 9: 359-270.
 36. Shigemoto R, Nomura S, Ohishi H, Sugihara H, Nakanishi S, Mizuno N. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci Lett* 1993; 163: 53-57.
 37. Sladeczek F, Momiyama A, Takasashi T. Presynaptic inhibitory action of a metabotropic glutamate receptor agonist on excitatory transmission in visual cortical neurons. *Proc Soc Lond B* 1993; 253: 297-303.
 38. Tanabe Y, Nomura A, Masu M, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Signal transduction, pharmacological properties and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 & mGluR4. *J Neurosci* 1993; 13(4): 1372-1378.
 39. Abe R, Sugiura H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺-signal transduction. *J Biol Chem* 1992; 267(19): 13361-13368.
 40. Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, et al. Molecu-

- lar characterization of novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 11868-11873.
41. Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Nakanishi S. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 1992 ; 8 : 169-179.
42. Masu M, Tanabe Y, Nakanishi S. Sequence and expression of metabotropic glutamate receptor. *Nature* 1991 ; 349 : 760-765.