

新潟大学脳研究所創立25周年記念講演会

2) NMDA 受容体の分子的多様性

〔座長 永井克孝 新潟大学脳研究所客員教授〕

新潟大学脳研究所神経薬理学部門教授

三 品 昌 美

三 品 昌 美 (みしな・まさよし)

昭和46年 京都大学工学部卒業

昭和51年 京都大学工学部研究科博士課程修了

昭和53年 Alexander von Humboldt 財団奨学研究員
Erlangen-Nürnberg 大学生化学研究所 留学

昭和55年 Zürich 大学分子生物学研究所 留学

昭和56年 京都大学医学部 助教授

平成2年 新潟大学脳研究所 教授

Molecular Diversity of the NMDA Receptor Channel

Masayoshi MISHINA

*Department of Neuropharmacology,
Brain Research Institute, Niigata University*

The glutamate receptor channel plays a key role in brain function. Most of the fast excitatory synaptic transmission is mediated by glutamate receptor channels in the central nervous system. Furthermore, glutamate receptor channels are essential for activity-dependent synaptic plasticity such as long-term potentiation and long-term depression, which are thought to underlie memory acquisition and learning. Evidence is accumulating that glutamate receptor channels are involved in experience-dependent synaptic plasticity during development and degenerative brain disorders.

We have identified more than a dozen subunits of the mouse glutamate receptor channel by molecular cloning. These glutamate receptor channel subunits possess four putative

Reprint requests to: Masayoshi MISHINA,
Department of Neuropharmacology,
Brain Research Institute, Niigata
University, Asahimachi-dori 1,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経薬理 三品昌美

transmembrane segments characteristic for neurotransmitter-gated ion channels and have been classified into six subfamilies (α , β , γ , δ , ϵ and ζ subfamilies) according to the amino acid sequence homology. The members of the α subfamily constitute AMPA-selective glutamate receptor channels, whereas the β and γ subfamilies include the subunits of the kainate-selective glutamate receptor channel. The ϵ and ζ subfamilies represent the subunits of the NMDA receptor channel.

NMDA receptor channels with high activity are formed only when the distantly related ϵ and ζ subunits are expressed together. Four ϵ subunits of the NMDA receptor channel (the $\epsilon 1$, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ subunits) are distinct with each other in distribution, function and regulation. In contrast to the wide distribution of the $\epsilon 1$ and $\zeta 1$ subunit mRNAs in various neural cells, the $\epsilon 2$ subunit mRNA is expressed selectively in the forebrain. The $\epsilon 3$ subunit mRNA is found predominantly in the cerebellum, whereas the $\epsilon 4$ subunit mRNA is weakly expressed in the brainstem and the diencephalon. Of the four ϵ/ζ heteromeric channels, the $\epsilon 4/\zeta 1$ channel exhibits the highest apparent affinities for L-glutamate and glycine, and the $\epsilon 1/\zeta 1$ channel the lowest affinities. Furthermore, the $\epsilon 1/\zeta 1$ channel is most sensitive to APV, whereas the $\epsilon 3/\zeta 1$ channel is most sensitive to 7-chlorokynurenate. The $\epsilon 4/\zeta 1$ channel is least sensitive to both antagonists. Remarkably, the $\epsilon 3/\zeta 1$ and $\epsilon 4/\zeta 1$ channels are less sensitive to voltage-dependent Mg^{2+} block than the $\epsilon 1/\zeta 1$ and $\epsilon 2/\zeta 1$ channels. These findings suggest that the functional properties of the NMDA receptor channel are critically determined by the constituting ϵ subunit, and thus the molecular diversity of the ϵ subunit family underlies the functional heterogeneity of the NMDA receptor channel.

Because the activity-dependent change in synaptic efficacy mediated by the NMDA receptor channel is found in forebrain regions such as the hippocampus and the visual cortex, it is likely that the $\epsilon 1$ and $\epsilon 2$ subunits highly expressed in the forebrain plays an important role in the synaptic plasticity. In accord with this assignment, the $\epsilon 1/\zeta 1$ and $\epsilon 2/\zeta 1$ channels are highly sensitive to Mg^{2+} block, which is essential for the NMDA receptor channel to mediate the induction of the activity-dependent long-term potentiation of synaptic efficacy. On the other hand, the distribution of the $\epsilon 3$ subunit mRNA and the resistance of the $\epsilon 3/\zeta 1$ channel to Mg^{2+} block suggest that the $\epsilon 3$ subunit is a key component of cerebellar NMDA receptor channels mediating mossy fibre-granule cell synaptic transmission. We have also shown that treatment with TPA enhances the channel activity of the $\epsilon 1/\zeta 1$ and $\epsilon 2/\zeta 1$ channels, but not the $\epsilon 3/\zeta 1$ and $\epsilon 4/\zeta 1$ channels. Thus, modulation of the $\epsilon 1/\zeta 1$ and $\epsilon 2/\zeta 1$ channels by protein kinases may play a role in determining the threshold of the induction of long-term potentiation, since Ca^{2+} entry through the NMDA receptor channel triggers the persistent change in the efficacy of synaptic transmission.

Voltage-dependent Mg^{2+} block is the key to the depolarization-dependent activation of the NMDA receptor channel, which is the basis of an activity-dependent change of synaptic efficacy. All subunits of the NMDA receptor channel possess asparagine in putative transmembrane segment M2 at the position corresponding to glutamine and arginine of the α subunits that determine the Ca^{2+} permeability of the AMPA-selective glutamate receptor

channel. Replacement by glutamine of the asparagine strongly reduces the sensitivity to Mg^{2+} block of the $\epsilon 2/\zeta 1$ heteromeric NMDA receptor channel. Furthermore, the heteromeric channel with the mutation on both subunits becomes resistant to a channel blocker, MK-801. These findings suggest that the conserved asparagine in segment M2 constitutes a Mg^{2+} site of the NMDA receptor channel, and that the MK-801 site overlaps the Mg^{2+} site.

Key words: Glutamate receptor channel, Memory, Molecular biology, NMDA receptor channel, Synaptic plasticity

グルタミン酸受容体チャネル, 記憶, 分子生物学, NMDA 受容体チャネル, シナプス可塑性

二年前の春に本研究所に招いて頂きまして、それ以来夢中で走ってきたというのが実感です。そこで講演をするというよりは、実際にこの二年の間にどう考えてどのようにやってきたかということをお話しさせて頂きたいと思います。自由に研究出来る場を与えて頂いて一番最初に考えたことは、本当に大事なことをやろうということです。失敗しても首になることも死ぬこともないから、自分が正直に重要だと思えることを真正面からやってみよう。そういう研究は競争も激しいし、途中で潰れる確率も高いが、恐れずにやろうと考えました。そして、現助教授の崎村君と一緒にやろうというので研究が始まりました。

遺伝、適応、免疫、癌、発生、記憶と、普通の人が日常使っている生物学的な現象を並べてみました。子供は親に似るわけですし、誰でも新しい環境にゆけば適応していきます。我々は異物に対して抵抗力を持っていますし、癌にもなります。また、受精卵から発生して個体ができる。我々は誰もが記憶を持って生きている。これらの生命現象は、日々実感出来ることです。この半世紀は生物学の時代だと言われています。このような生物学的な現象や概念が、実際に分子のレベルや遺伝子のレベルで理解されるようになってきました。もちろん皆さん良く御存知のように、遺伝現象に関しては Watson と Crick の DNA 二重らせんモデルにより遺伝情報を忠実に複製する遺伝の基本メカニズムが解き明かされたわけです。また Jacob と Monad のオプロン説により生物がある環境に適応する分子機構が理解されてまいりました。さらに免疫の多様性が抗体遺伝子の組み換えに基づくこと、発癌の原因がオンコジーンであることが明らかにされてまいりました。最近では発生学者によって想定されてきた位置情報という発生の中心的概念が、ホメオボックス遺伝子として解明されてまいりました。このように様々

な生命現象が具体的な分子に基づいて理解されるようになってきました。それでは、記憶はどうでしょうか。分子レベルで理解可能なのでしょうか。脳神経系は生物学最後のフロンティアであり、物質とは一番遠い存在だと考えられているのではないのでしょうか。しかしながら、我々が日々経験するがその機構に関しては全く未知の記憶という生命現象は、多くの人の興味を集めて来ました。

発見は突発的に起こるように見えますが、その背景には多くの事実や知見の集積があるのが通例です。私の考えでは、記憶に関する非常に重要な知見が三つあると思います。その一つは理論的研究です。Hebb が神経系のネットワークを考えた場合に、素子間の情報の伝わり方がコンピュータのように固定されていれば多くの作業をすることは出来るが、我々が日常経験しているような記憶とか学習は出来ない。ところが、神経細胞のネットワークに可変性のシナプス、すなわち入力とか経験によって情報の伝わり方が変わり得るようなシナプスを考えれば、記憶とか学習が可能であるという理論を展開しました。ここに、入力とか経験によって変わり得る可塑性シナプスという概念が提示されたわけです。二つ目の知見は臨床医学から得られました。テンカン治療の目的による脳外科手術あるいは外傷によって海馬を中心とする領域に損傷を受けた患者さんは前行性の健忘症に陥る、すなわち古いことは覚えていて新しいことを覚え込むことが出来ないということが見い出されました。したがって、海馬とその周辺が記憶の獲得に重要な役割を担っていると考えられるようになりました。最後に生理学者の Bliss と Lømo が 1973 年になって高等動物の脳に、しかも記憶に重要とわれてきた海馬に、実際に可塑性シナプスがあるということを見い出しました。

それでは、生理学者が見つけてきたシナプスの可塑性について説明いたします。海馬の CA3 野から CA1 野

に情報を伝えるシナプスの前繊維に単発刺激を与えますと、一定の応答が得られます。単発刺激を何回与えても一定の情報が伝わって、CA1野の錐体細胞が一定の応答、一定の興奮を示します。ところが一過性に非常に強い刺激を与えますと、シナプス後部に非常に強い興奮が起こりますが、このテタヌス刺激のように非常に強い入力を経験した後は、以前と同じ単発刺激に対するシナプス後部の応答が大きくなることが観察されます。しかもこの大きくなった応答は、強い入力があったのはたった一回の経験ですが、非常に長い時間、日を越えて持続することが見い出されました。この現象はシナプスの長期増強と名付けられ、恐らく我々の記憶・学習の基礎となる機構であろうと考えられています。このシナプス長期増強は海馬や大脳皮質の幾つかのシナプスで多くの研究者が観察しており、中枢において再現性のある現象であることが確立しています。

さらに、生理学者らの研究によりまして、シナプス長期増強の機構の一部が明らかになってまいりました。海馬CA3野の錐体細胞からCA1野の錐体細胞へのシナプス伝達の神経伝達物質はグルタミン酸であります。シナプス前細胞の興奮によりグルタミン酸が放出されます。シナプス後膜にはグルタミン酸の受容体が存在しており、グルタミン酸が結合すれば自分自身の持つチャンネルを開口してナトリウムイオンを流入させることにより、神経情報を伝えます。シナプス後膜には異なった種類のグルタミン酸受容体チャンネルが存在しており、薬理的にNMDA受容体チャンネルと呼ばれています。NMDA受容体チャンネルはマグネシウムイオンで塞がれているため、通常のシナプス伝達には働いていないとされています。ところが非常に強い刺激が入ってきた場合には、まずAMPA/カイニン酸型のグルタミン酸受容体チャンネルが働いてシナプス後膜が強く興奮し、膜内外の電位差が減少しますとマグネシウムイオンの阻害が外れて、NMDA受容体が働きます。すなわち強い入力刺激をNMDA受容体チャンネルが感知するわけです。NMDA受容体チャンネルはナトリウムイオンも通過させますが重要なことはカルシウムイオンに対しても高い透過性を持っていることです。カルシウムイオンの流入がその後に引き続くシナプス伝達効率の長期増強に必須であることが示されています。

そういたしますと、NMDA受容体チャンネルが記憶の基盤と考えられているシナプス可塑性を司る重要な分子だということになります。ここまでくると、分子生物学者が手が出せるようになります。それでは記憶に重要だ

と考えられているNMDA受容体チャンネルを分子として明らかにし、さらに分子から記憶・学習の機構を探索しようと考え、研究を始めました。グルタミン酸受容体チャンネルは、高等動物の中枢における速い興奮性シナプス伝達の大部分を担っています。さらにシナプスの長期増強あるいは長期抑圧という記憶・学習の基になっていると考えられているシナプス可塑性に中心的な役割を果しております。神経系の発生・発達期におけるニューロンネットワークの形成・シナプス形成が外界からの入力刺激すなわち経験により影響されることはよく知られております。発生期のニューロンネットワーク形成にもNMDA受容体チャンネルが重要だということがわかってまいりました。またNMDA受容体チャンネルがカルシウムイオンに対する高い透過性をもっておりますために、NMDA受容体チャンネルの異常な活性化が神経細胞死の引き金になり、このため急性および慢性的な変性疾患の原因にもなる可能性が指摘されております。したがって、グルタミン酸受容体チャンネルは脳の高次機能および病態に密接に関係し、非常に興味深い分子であります。

グルタミン酸受容体は大きく自分自身がチャンネルを持っている受容体チャンネル複合体とG蛋白を介してチャンネルや、例えばセカンドメッセンジャー系を動かすような酵素の活性を修飾することにより神経系の情報伝達を調節しているG蛋白共役型に大別されています。今日お話しするチャンネル型グルタミン酸受容体はさらに薬理的にNMDA型とカイニン酸型およびAMPA型の三つのサブタイプに分類されることが提唱されておりました。

ちょうど私どもがクローニングを始めました時に、米国Salk研究所のHeinemannのグループがカイニン酸型グルタミン酸受容体チャンネルの一つのサブユニットをラットの脳からクローニングしたと発表しました。我々は個体レベルで高次機能を探索したいと考えていましたので、トランスジェニックの技術が進んでいるマウスの脳から対応する $\alpha 1$ サブユニットをクローニングし、これを出発材料に、グルタミン酸受容体チャンネルは基本構造が似ているという仮定のもとに、似た分子をマウスの脳からクローニングすることにいたしました。機能的性質がAMPA/カイニン酸型受容体チャンネルとは大きく異なるNMDA受容体チャンネルがこの方法で単離できるか不安もあり、発現によるクローニングの準備もしましたが、色々工夫を重ねることにより、最終的には多くの類縁分子が見つかってまいりました(図1, 2)。最初に単離した $\alpha 1$ サブユニットと $\alpha 2$ サブユニットによく似た $\alpha 3$ サブユニットと $\alpha 4$ サブユニットを崎村

$\alpha 1$	MPYIFAFFCTGFLGAVVGANFPNNIIGGLFPNQSSQEHAFRFALSQLT-EPPKLLPQTIDVINSDSFE	51
$\alpha 2$	MQKIMHISVLLSPYLWGLIFGVSSNISIGGLFPRGADOEYSAFRVGVQFSTSEFRLTPHIDNLEVANSFA	51
$\beta 1$	MKIIISPVLSNLVFSRSIKVLLCLLWIGYSQGTTHVLRFGGIFEVESGPMGAELAFRAVNTINRMTLNTPTTLTYDTQKINLYD	59
$\gamma 2$	MPAELLLLIVAFAPSCQVLSLRMAAII LDDQTVCGRGERLALALAREQINGIIEVPAKARVEVDFELQDSDOYE	63
$\delta 1$	MEALTVLLPWICQCVTVRADSIHIGAI FEENAAKDRVFQLAVSDLSNDIILQSEKITVYIKVIEANNPFD	59
$\alpha 1$	MTYRFCSQFSKGVYVIFG-FYERRTYNMLTSCGALHVCFI-----TPSPVDTSNQFVLQRLPEALISIDHYKWD	125
$\alpha 2$	VTNAFCSQFSRGVYVIFG-FYDKKSVNTITSCGTLHVSFI-----TPSPFDGTGHPFVIMQRPDLKALLSLIEYVWD	125
$\beta 2$	ASKKACDQSLSGVYVIFG-PSHSSANAVGSHCHALGVPHI-----QTRWKHOVSQNKDSFVSLYDFSSLSRAILVDVQFFKWK	139
$\gamma 2$	TTDTMCQILPKGVIVSLGSPSSPASASTVSHIGKEKEIPH-----KVGPEETPRQLQVLFASVSLYPSNEDYSLAVSR	138
$\delta 1$	AVQEACDLMTQGLAVT-STGCASALALQSLTDMHIPHLFVQRNPGGSPRTACHLNPSPDGEATLASRPPVRLNMLRVLTVLWQ	148
$\alpha 1$	TFVYIVDADRLSVLRVITDAAEKNQVQVAVN-----ILTTTEEGYRMFDQLEKKMERLVVVDCESERLNALGQIVKLEKNGIGY	208
$\alpha 2$	KFAYLVDSRGLSTQAVLDSAAEKKQVQVAINVGN-----NNDKDETYRSLFDQLEKKMERVILDCERDKVNDIVDQVITIGKHVKGY	212
$\beta 2$	TVTVVYDSTGLIRLDELKAPSRYNLRKIR-----QLPADTKDAKPLKEMKRGKEFHYIDCSHEMAAGIKQALAMGMMEYV	221
$\gamma 2$	LKSFNVPASLIIKAKAECILRLLELVGRGLSKETLSV-RMLDSDRDPPLKEIRDQKVTSTIIDANASISHLVRKASELGMTSAF	226
$\delta 1$	KFVMEYVSEYDIRGFQSLDQASRLGLDVSQKVDKNISHVFTSLFTTMKTEELNRYRDTLRALLLSLQGAHGFINEAVEYTNLASKDS	238
$\alpha 1$	HYILANLGFMDIDLNKKESSANVTFGLVNYTDTIPARIMQWRTSDARDHTRVDW---KRPKYTSALTIDGKVYMAEAFQSLRRI	294
$\alpha 2$	HYILANLGFDTGDLKIQFGGANVSGFIVVYDSSLASKFIERWSTLEGKEYPGAHT---ATIKYTSALTIDAVQVMTAEFRNLKRI	298
$\beta 2$	HYIFITLLDFALDVEPYRYGVNMTGFRILNTENTQVSSI EKWSMERLQAPPKPSGLDGFMTTDAALMYDAVHYVSVAV-----QQ	305
$\gamma 2$	KVILTTMDQFILLHDGIVEDSSNIGFSMFTSHFPYFVRSLNMSWRENCEASTY---PGPALAMLDADAVHYVSVAV---RELNR	309
$\delta 1$	HWVFFNEISDPEILDLVHSLGRMTVYRQIFPSAKDNQKCMNNHRISSLLCDPQEGVL-QMLQISNLVLYDVLNLANF---HRKLED	325
$\alpha 1$	DISRRGNAGDCLANPAVPGGGLIDIORALQVRFEGLTGNVQFN-----EKGRRTNYTLHYIEKHDFIRKIGVYNEDDKFVPAATA-Q	378
$\alpha 2$	EISRRGNAGDCLANPAVPGGGLIERALQVQVEGLSGNIKFD-----QNGKRIINYITINIMELKTNDPKKIGYSEVQKMWVTEL-P	382
$\beta 2$	FPQMTVSSLGIC-NRHKPMRFGTRFMSLIEKAHWEGLTGRIIFN-----KTNGRLTDFDLVDVLSLKEEGLKIGMDPSSGLNMTSESQKG	389
$\gamma 2$	SQIEGVKPLAC--TSANIPHGHSMLNMYLRMVEYDGLTGTVFEN-----SKGORTNYTLRIEKSROGRLIGVYNSRNLAMNATL--	390
$\delta 1$	RKWHSMASLNCIRKSTKPNVGGRSMLDITKKGHITGLTGVMFREDSSNPVYQVEILGTTYSETFGDKMKRLATWSEKGLNGSLQER--	413
$\alpha 1$	AGGDSSVONRIVITTTILEPYYMLKKNANQFEGNDRIEYGVCLAAEIAKHVDSYRLEIVSDGKYGARDPDKAWNGMVGEIVYGRA	468
$\alpha 2$	SGNDTSGLENKIVVTTTILEPYYMKKNHEMLEGNERIEYGVCLAAEIAKHGCFNKYKLTIVGDKYKARGADATKIWNGMVGEIVYKKA	472
$\beta 2$	PANITDSLSNRSILVTTTILEPYYLFFKSKDPLVGNDRFEGYCIIDLRELSTILGFTIYERLVEDGKYGAQDDVNGQWNGMYRELIDHKA	479
$\gamma 2$	DINLSQTLANKITLVVTTILEPYYRRPNFQALSGNERIEYGVCLAAELAELLFRMYRLRYEDGLVGAPEP-NGSMVNGVGEILNRKA	479
$\delta 1$	--PMGRSLQGLTILKVYITVLEPYYMV--AENILGQPKRYKGSIDVLDALAKALGFYIEIYQAPDGRGHQHL-NTSWNGVIGELISKRA	498
$\alpha 1$	DVAVAPLITITLVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKPKQSKPGVFSFLDPLAYEIMMCIVFAYIGVSVYLVLSRFSPEYWHSEEFEEGRDQ	558
$\alpha 2$	DIAIAPLITITLVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKPKQSKPGVFSFLDPLAYEIMMCIVFAYIGVSVYLVLSRFSPEYWHTEEFDEGRGT	562
$\beta 2$	DIAVAPLAITITLVREEVIDFSKPFMTLGISILYRKPNGTNPVGFSLNPLSPDMMVYLLACLGVSCVLFVIAFISPEYVYNPHPC---NP	566
$\gamma 2$	DIAVAAFTITAEKEKVIDFSKPFMTLGISILYRVHMGKPKGVFSFLDPPSPAVMLFMLLAYLVSCVLFIAAARISPEYVYNPHPLC--RA	567
$\delta 1$	DIAISAITITIPRESVIDFSKRYMDYSVGLIKKPEEKI-SIFSLFAPDFDAVMACIAAAIPVYGVLEFVNLRIQAVRSQ-----SA	579
$\alpha 1$	TTSDQSNFEGFINSWFLSGAFMQGQCDISPRSLSGRIVGGVWFFTLIISSYTNLAALFTVERMVSPISAEADLAKQTEIAYGTLEA	648
$\alpha 2$	QSSSETFEGFINSWFLSGAFMQGQCDISPRSLSGRIVGGVWFFTLIISSYTNLAALFTVERMVSPISAEADLSQTEIAYGTLS	652
$\beta 2$	DSDDVENFTLLNSFVFGVGLMRQSELMKALSTRIVGGVWFFTLIISSYTNLAALFTVERMVSPIDSDADLAKQTEIAYGAVED	656
$\gamma 2$	RPHILENOYTLGNLSWFPVGGFMQDQSEVMPRALSTRIVGGVWFFTLIISSYTNLAALFTVORMVSPVSEADLADDTINIEYGTIHA	657
$\delta 1$	TQPRPSASATLSHAIIIVVGAIVQGGSESSVAMRIVMGSWVLETLIVCSSYTNLAALFTVSRMDNPRITQDLSQKLEMSYGTYRD	669
$\alpha 1$	GSITKEFFR-----RSKIAVFEKMW-TYMKSAEPSVFRITTEEGMIRVRKSKGKYALLLESTMNEY-IEQRKPCDQTMKVGQNLDSKGYGI	730
$\alpha 2$	GSITKEFFR-----RSKIAVFDKMW-TYMRSAEPSVFRITTAEGVARVRKSKGKYALLLESTMNEY-IEQRKPCDQTMKVGQNLDSKGYGI	734
$\beta 2$	GATMTFFK-----KSKISTYDKMW-AFMSRRROSILVKSNEEGIQVLTLS-DYAFLEMTSTIIEF-VTQRNCLNTOIGGLIDSKGYGV	735
$\gamma 2$	GSITMTFFK-----NSRYQTQRMW-NYHDSKQPSVFKSTEEGIARVLSN--RYAFLESTMNEY-HRRNLNCLNTOIGGLIDSKGYGI	736
$\delta 1$	SAYVEYERAKGNTPLEQDSTFAELMRTISKNGGADNCSNPSEGIIRKAKKG--NYAFLDVAVVEYAAALDDDDSVTVIGNSISXKGYGI	757
$\alpha 1$	ATPKESALRPGYNLAIVKISEGVIDKLKSKWVWDKECG-SKDSGSKDTSALSLSNVAGVYFIIIGGLGLAMLVALIEFCYKRSSEK	819
$\alpha 2$	ATPKESLGNAYNLAVKINEGGLDKLKNKWWYDKCEG-SGGDSKDKTSALSLSNVAGVYFIIIGGLGLAMLVALIEFCYKRAEK	823
$\beta 2$	GTPMGSPPYRDKITAILLODEEKGKLMHMKKWWRGNC-C---PEESKEASALGVQNIIGIIFVLAAGLVSVFVAGFEFLYKSKTTLN	820
$\gamma 2$	GMPILGSPFRDEITAILLODENRRLILKRWVW-EGRC---PKEEDHRAKGLGMEIIGIIFVVLICGLIIVAFVAVMEFIVSTRRSSE	821
$\delta 1$	ALQHGSPPYRDLFSQRIELQDQDGLDVLKRWVWPHTRGCDLTSHTSQTQEGSLKLHSGFAGVFCILAILGLLACLVALELWNSNRCHQ	847
$\alpha 1$	RMKGFLCIPQQSINEAIRTSLPRNSGAGAGSGSGSGENGVRQSDFPKMSQIPCMSSHSGMPLGATGL	889
$\alpha 2$	RMKVAKNAQINPSSONSQNFATYKEGYNVYIEVSKI	862
$\beta 2$	WKRGPSVAPWKN	833
$\gamma 2$	SEEVSGQCEMLQELRHAVSKRKTSSRRRRRPGPSRALLSLRAVREMRLSNGKLYSAGAGGAGAHGQPRLDDPGPPGGPRPOAPT	910
$\delta 1$	ETPKEDKEVNLQYHRRINSLMDEIDIAHKQISPAISLSELMGGLAPSQALETREYQNTQLSVSTFLPEQSSHGTSRLSSGSSNLP	937
$\gamma 2$	CTHVRVCQECERRIQALRASGAGAPRGLGTPAEATSPRRPRPGTGPRELTEHE	965
$\delta 1$	LPLSSSATMPSIQCKHRSNPGGLFRQSPVKTIPIWFSQPVGGVLPEALDTSHTSI	994

図 1 AMPA/カニン酸型グルタミン酸受容体チャネルを形成する α 、 β および γ サブユニットならびに δ サブユニットの一次構造。各サブユニットは4箇所(1)の推定膜貫通領域(M1-M4)とアミノ末端にシグナルペプチド(成熟サブユニットのアミノ末端を□で示す)を有していると考えられる。相同性を示すため同一のアミノ酸を囲っている。AMPA 選択的グルタミン酸受容体チャネルの Ca^{2+} 透過性を決定している M2 領域のグルタミン($\alpha 1$ サブユニット)およびアルギニン($\alpha 2$ サブユニット)の位置を▼で示す。

1	MGRIGYTLTLLPALLUWHGPA	DNAAEKGTPALNIA	ULLGHSHDUTERELRNWGPEQATGLPLDUNUUALINRTPKSLITHU	64
2	MKPSACECSKFKVLULAU	LAUSGSKRSQKSAPSIGIA	UILUGTSD--EVAIKDAHEKDDHFLVUUPRULVUANETPSKILTRI	59
3	MGGALGPALLTSLTLAGAW	LAGAGGGEQAVUUFVGS	SGPL--QAQARTRITPQNLDPLEIQLPTIGUNNTNPSKILTOI	62
4	MRGAGGPRGPRGPAKMLLL	LALACASPPEEUPGGAAG	GGTGGARPLNUALUFSGPAYAAEARLGPAAUAARSPLDURPUALU	73
5	MSHMLTFLALLSCSFARAC	DPKIUINIGVULSTRKHEQMF	REAUQANKRHSQKILQNAITSUTHKPNALQMALSUCE	62
1	CDLMSGARHALLUFGDDT	DOERAMMDFAISSOTF	IPILGIGHGSSMIMADKPTSTFFOFASISQCATMLKIMQYDHFSLUIT	164
2	CDLMSDRKIGUMLADDT	DOERAMMDFAISSOTF	IPILGIGHGSSMIMADKPTSTFFOFASISQCATMLKIMQYDHFSLUIT	159
3	CDLGAARUHGIFEDNU	TEUAGUAGLDFUSSOT	THUPLISISGSAUULTPEKPGSAFLLQGLUSLEQULFKULEYDUSAF	162
4	CDLSSGLRUHGLFED	SDRAPPALPILDFUSS	OTTHUPLISISGSAUULTPEKPGSAFLLQGLUSLEQULFKULEYDUSAF	173
5	DLTSSQUYAILVSHPT	TPNDHFTIPUSYTAGFY	RIPLGL--TRMSIYSKSIHLSRLTUPPYSHSSUWFEMHRULYNNH	159
1	IKTTUDNSFUDGMNUIT	LDTSFED--AKTQULKKIH	SSUILLVSKDEAULILSEARSGLTGYDFFIUPSLSU-----	251
2	IRSTIENSFUDLEEU	LLDMSDDGDSKIQNKL	GLSPILLVYTKKEATYIFEUANSUGLTIGYGTMLUPSLSU-----	248
3	URAVADASYLRLLD	ULTLGPAGPRARTARLL	QVDPAPULUAYCSREEULFAEAOHGLUOPGHMLUPSLSU-----	251
4	TEULTDGLUCDEHR	GLDUPGAGE--AULGA	LRSSVASIRLLHAREAEPUFRAGEHGLTIPGYTUMFUGPLAGGG	271
5	KRLTLLERESKAEL	KULGDPGKTNUALLMEA	--RDEARUILLASEDDHRTATUYRAAMLNHTGSGYULUGE-----	245
1	SGLSUSYDDYSLEA	RTADLGLITTPASSMLEK	FSYIPKAKSYGGATEKPEPLHTLHOFNUTMDGDLSTEEGYQUFRLU	351
2	TGLISUSYDEYGLP	ARURDGLAITTASDML	SEHSFIPKPKSCYNTHKRIYQSNMLNRYLNUITFEEDGRLSENK	348
3	UGLISUUTESYLRL	LRKIDRDUAILALCH	SYRRQYGTLPAPAGDRSHPGPSAREAFYRLNUINEGRDPS	351
4	AGLFAUSAGLID	LRARAGUAUAGRGALL	RDYGLFLEHGDH--RAQNRTHRGESHRYFTLNUIDNRDYSFN	369
5	DGILGLQLINKNES	AHISDAUGUUAUHEL	LEKENITTPRCUGNTINWKTGPLKRLULHSSKYADGUTGRUE	345
1	KUGKINQNTLR	RAHAUPLRYKFS	DCEPDDNHLSTLEBAFFUTU-----EDIPALTEYJURNTPCR	442
2	TGLISUSYDEYGLP	ARURDGLAITTASDML	SEHSFIPKPKSCYNTHKRIYQSNMLNRYLNUITFEEDGRLSENK	439
3	MUGLMDHGLUL	YNYKYUPLRYSTSL	GPUDDSRLTUATLEBAFFUTU-----ESDPPGTGGCUPNTUP	443
4	UGLISUUTESYLRL	LRKIDRDUAILALCH	SYRRQYGTLPAPAGDRSHPGPSAREAFYRLNUINEGRDPS	462
5	UGTYNTHUTPNDR	KILUPGGETEKPRGY	QMSRLKIUTIHQEFYUKPTMSDGTCKEEFTUNGDPYKUICT	445
1	KKLSRTUKFYD	LYLUTNGK-----	HGKUNNUNGMIGEUYGRAMUAGSLTINEERSEUUDFSUP	536
2	KKLSKSUKFYD	LYLUTNGK-----	HGKUNNUNGMIGEUYGRAMUAGSLTINEERSEUUDFSUP	533
3	KKLSKSUKFYD	LYLUTNGK-----	HGKUNNUNGMIGEUYGRAMUAGSLTINEERSEUUDFSUP	537
4	KKLSKSUKFYD	LYLUTNGK-----	HGKUNNUNGMIGEUYGRAMUAGSLTINEERSEUUDFSUP	556
5	KKLSKSUKFYD	LYLUTNGK-----	HGKUNNUNGMIGEUYGRAMUAGSLTINEERSEUUDFSUP	545
1	UMFUMUULHSA	LAUFEEFSPUAYNN	AKKAPHPSFTIGKAILLULUUFNNSUPUNPKGITSKINUSUA	636
2	UMFUMUULHSA	LAUFEEFSPUAYNN	AKKAPHPSFTIGKAILLULUUFNNSUPUNPKGITSKINUSUA	637
3	UMFUMUULHSA	LAUFEEFSPUAYNN	AKKAPHPSFTIGKAILLULUUFNNSUPUNPKGITSKINUSUA	633
4	UMFUMUULHSA	LAUFEEFSPUAYNN	AKKAPHPSFTIGKAILLULUUFNNSUPUNPKGITSKINUSUA	642
5	LLU-GLSUA	LAUNLYLDRFHS--	FGFRKUNSEEEEDALISARHESGULINSGTGEGARFS	656
1	UDUULGLSKK	FORPNDSPFF	RFGTUPNGSTERNIRNN--MYTHAYTHKFNQGUEDALUSL	734
2	UDUULGLSKK	FORPNDSPFF	RFGTUPNGSTERNIRNN--MYTHAYTHKFNQGUEDALUSL	731
3	UDUULGLSKK	FORPNDSPFF	RFGTUPNGSTERNIRNN--MYTHAYTHKFNQGUEDALUSL	735
4	UDUULGLSKK	FORPNDSPFF	RFGTUPNGSTERNIRNN--MYTHAYTHKFNQGUEDALUSL	754
5	UDUULGLSKK	FORPNDSPFF	RFGTUPNGSTERNIRNN--MYTHAYTHKFNQGUEDALUSL	735
1	RTTGYGIALK	SGSKRAIDALL	LOFVGDDEEELTLULGICHNEKNEUMSSQLDINMAGUFYML	834
2	RTTGYGIALK	SGSKRAIDALL	LOFVGDDEEELTLULGICHNEKNEUMSSQLDINMAGUFYML	831
3	RTTGYGIALK	SGSKRAIDALL	LOFVGDDEEELTLULGICHNEKNEUMSSQLDINMAGUFYML	833
4	RTTGYGIALK	SGSKRAIDALL	LOFVGDDEEELTLULGICHNEKNEUMSSQLDINMAGUFYML	852
5	FRSGLIGNR	SGSKRAIDALL	LOFVGDDEEELTLULGICHNEKNEUMSSQLDINMAGUFYML	834
1	PGLLFSISRG	YISCHIGUHI	EIEKK--KSPDNLTGSQSNMLLRS	929
2	PAMUFSISRG	YISCHIGUHI	EIEKK--KSPDNLTGSQSNMLLRS	927
3	LDLFAFISRG	YISCHIGUHI	EIEKK--KSPDNLTGSQSNMLLRS	930
4	MDLFAFISRG	YISCHIGUHI	EIEKK--KSPDNLTGSQSNMLLRS	945
5	AAUNUKML	QDRKSGR	AEPPDKKATFRATISLASSFKRRSSKDTSGGGRGALNQKDT	920
1	KDSIFGEM	NMELQ--TFUANR	HKDLSNYUFGQHPLTLNESNPNTUEVAUSTESKGNRPRQ	1026
2	CEENLFS	YSEVERTF	GNLQKDS--NUYQDHYH--HHRHPSIGSTSSIDGLYDC	1020
3	PSGWRPP	--GGRTPLARR	APPARPAPGAGRLSPTCPEHPAGTLGMRGGCESGIR	1029
4	GEARAA	PRAGARPLSPPT	TQPPQKPPSYFAIUREGEPAEPAGAPGPGSP	1045
1	PRYL-PEE	VAHSDIS	ETTSRACHREPDNNKNHKT	1120
2	DRYSGH	DLIRSDU	ISTHTUTYRNIEGNAAKRRKQYKDSLKKR	1120
3	PEPDL	PLLGP	EQALRRALLAAWARGPRPRHASLPSUA	1129
4	ARAL	GRPHHRRURT	APPCCAYLDLEPSSDSEDESLSGASLGGLE	1145
1	ENUDFP	PDYQDHENFR	KDSTLPHNRNPLHNE	1215
2	HQWRL	TDIYKERSDD	DFKR--DSUSGGPCTNRSHLKHGT	1217
3	WOPR	QHULHHTHLTH	PLFCWGTUACRPPSSHPWLGITWEP	1220
4	SLELL	LPPLHLSCHDGL	DGQWNAWPPPPAAGPPAPRRACGPR	1245
1	ACLR	MGNLYL	IDEDQMLQETGNPATR-E---EAYQ	1309
2	ACKKAG	NLYL	IDEDQMLQETGNPATR-E---EAYQ	1316
4	RLTGS	RHARRCPHARH	WGPLPTASHARRHGGDLGTRKGS	1296
1	PSS--KLL	GNKSSLP	QGLDESK-----RSKSLPLDHTSDN	1398
2	PAGESS	FANKSSUTTAGH	HNNPSSGYMLSKSLYPRDUTQNPFI	1416
1	DUYI	SEHUMPYAANK	NNMYSIPULNCSNRRUYK	1442
2	DICIGN	SNPCUPNNK	-----PRAFNGSSNGHUEK	1456

図2 NMDA 受容体チャネルを構成するεおよびγサブユニットの一次構造。各サブユニットは4箇所の推定膜貫通領域(M1-M4)とアミノ末端にシングルペプチド(成熟サブユニットのアミノ末端を□で示す)を有していると考えられる。相同性を示すため同一のアミノ酸を囲っている。NMDA 受容体チャネルのMg²⁺閉塞阻害部位を構成するM2領域のアスパラギンの位置を▼で示す。

君、櫛谷さん、荒木君たちがさらに類似性が低く β サブユニットおよび γ サブユニットと名付けた二つのサブファミリーを見い出しました。これらのファミリーは同時にアメリカのグループとドイツのグループも単離したと発表してきました。我々の研究室の人達は非常に粘って類似性のさらに低い新しいサブユニット群を発見してきました。これが非常に難しいことは、結果的にドイツのグループもアメリカのグループも発見できなかったことからわかります。最後に発見した ζ サブユニットと ϵ サブユニットが探し求めていた NMDA 受容体チャネルを形成する分子です。ちょうどこの頃に京大の中西先生のグループが発現クローニングの手法で ζ 1 サブユニットに相当するラットのサブユニットを単離されました。新しいサブユニット分子を発見し、クローニングするまでは、例えば γ 1 サブユニットファミリーは崎村君、櫛谷さんと森田君が、 δ 1 サブユニットは山崎雅俊君と荒木君が、 ϵ 1 サブユニットは目黒君と荒木君が、 ζ 1 サブユニットは山崎誠君と荒木君が、それぞれ担当していたのですが、あちらこちらから幾つかのサブユニットの報告が出始めると大変だということになり、去年の末くらいから皆で力を合わせて自分達が見つけてきた新しい分子を世界に発表しようということになりました。協力して進めるという形で始めて NMDA 受容体チャネルの多様性を決定している非常に重要な一群の ϵ サブユニットを我々が世界に先駆けて発表することが出来ました。

これが最近発表いたしましたマウス NMDA 受容体チャネルの五種類のサブユニットの一次構造であります(図 2)。細かいことは申し上げられませんが一つの非常に大きな特徴は、M1, M2, M3 および M4 の四箇所の疎水性領域があることです。疎水性領域の存在から我々はグルタミン酸受容体チャネルのサブユニットがどのようなトポロジーをとっているかについて推測しております。おそらく各サブユニットは疎水性の四つの領域で膜を貫通しており、M1 領域よりアミノ末端側の領域は膜の外側に位置していると推測しております。この構造は、先程永井先生からの御紹介にもありましたように、我々が最初に研究しておりました筋肉のアセチルコリン受容体チャネルの基本構造によく似ております。また GABA 受容体チャネルやグリシン受容体チャネルのサブユニットも同様であります。したがって、チャネルを内蔵する一群の神経伝達物質受容体は、一次構造の類似性はないものの非常に似た基本構造を共有していることが明らかになりました。

もっとも理解の進んでいるアセチルコリン受容体チャネルの場合には α , β , γ および δ の四種類のサブユニットが五つ集まって、その中央にイオンが通るチャネルを形成していると考えられておりますことから、おそらくグルタミン酸受容体チャネルも幾つかのサブユニットが集り中央にチャネルを形成していると推定しています(図 3)。

イギリスの Unwin のグループはアセチルコリン受容体チャネルの二次元結晶の電子顕微鏡解析から、解像度はまだ低いのですが、アセチルコリン受容体チャネルの形を実際に決定しております。アセチルコリン受容体チャネルを真上から観察した像から五つのサブユニットが花びらのように集まって中央にチャネルを作っていることが具体的に示されます。縦断した像から一つのサブユニットが膜を貫通している様子が示されます。シナプス間隙側に非常に大きな開口部があり、膜の中央部でチャネルが狭くなっています。おそらく最狭部でチャネル機能の調節が行われていると推測されます。我々は先にアセチルコリン受容体チャネルに人工変異を導入し、単一チャネルの機能を解析することにより、二番目の疎水性領域 M2 とその前後の負電荷を有するアミノ酸によってアセチルコリン受容体のチャネル内壁が形成されるということを明らかにしています。我々の研究から予測している構造と Unwin らが蛋白分子の解析から求めてきた形とは非常に良く一致しております。我々がグルタミン酸受容体チャネルを研究する場合には必ずアセチルコリン受容体チャネルで解明された事実を常に頭の中において考えを進めているわけです。

話をもとに戻しまして、実際にマウスの脳から十六種類のグルタミン酸受容体チャネルのサブユニットであろうと思われる蛋白分子を見つけてまいりました。我々は素直にこれらの分子を構造上の類似性で幾つかのサブファミリーに分類することにしました(表 1)。 α サブファミリー内のサブユニットは互いに70%位の相同性を示し非常に良く似ていますが、異なるサブファミリーとは40%以下です。これらのサブファミリーにギリシャ文字をあてまして α , β , γ , δ , ϵ および ζ と名付けました。

次に、クローン化した cDNA からもう一度機能をもった受容体を発現させてその性質を調べていきますと、この構造上の分類がサブユニットの薬理学的な性質と非常によく対応しているということが明らかになりました(表 2)。結論を先に申しますと、 α サブファミリーはいずれも AMPA に選択性の高いチャネルを形成します。

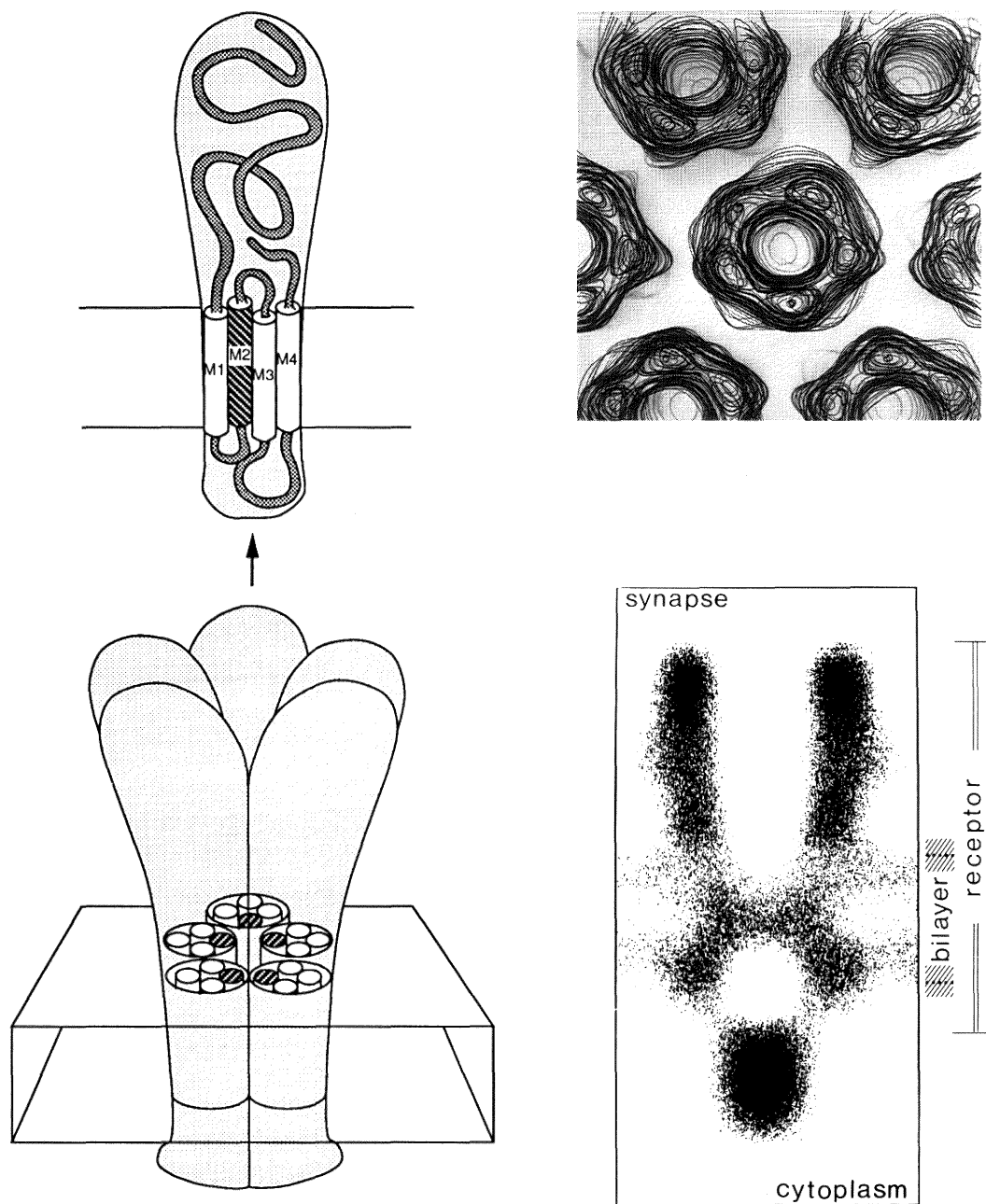


図3 アセチルコリン受容体チャネルの模式図(左)と電子顕微鏡像(右). 右上, シナプス間隙側から見た電子顕微鏡像 (Brisson and Unwin, Nature 315, 474~477, 1985). 右下, 中心部を縦切りにした電子顕微鏡像 (Toyoshima and Unwin, Nature 336, 247~250, 1988).

表 1 グルタミン酸受容体チャネルサブユニットのサブファミリーと一次構造の相同性.

Subfamily	α				β			γ		δ		ϵ				ζ
Subunit	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\delta 1$	$\delta 2$	$\epsilon 1$	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$	$\zeta 1$
GluR $\alpha 1$		66	64	66	36	37	37	34	32	25	23	14	13	15	15	18
GluR $\alpha 2$			72	70	36	37	35	31	30	23	23	13	13	15	14	20
GluR $\alpha 3$				71	36	38	35	32	31	22	22	12	12	14	13	19
GluR $\alpha 4$					36	36	36	30	30	23	23	13	13	15	15	20
GluR $\beta 1$						74	70	37	38	23	22	14	14	15	14	21
GluR $\beta 2$							72	39	37	21	22	11	12	13	13	20
GluR $\beta 3$								39	39	26	21	13	13	15	15	21
GluR $\gamma 1$									68	24	24	14	13	14	16	21
GluR $\gamma 2$										24	23	14	14	18	18	20
GluR $\delta 1$											56	14	15	17	16	19
GluR $\delta 2$												15	15	17	14	18
GluR $\epsilon 1$													52	40	39	18
GluR $\epsilon 2$														39	38	16
GluR $\epsilon 3$															49	18
GluR $\epsilon 4$																17

表 2 マウスグルタミン酸受容体チャネルサブユニットのサブファミリーと薬理学的特性. ラットグルタミン酸受容体チャネルのサブユニットは研究グループにより別々に命名されているため, 統一性がない.

Subfamily	Subunit	Pharmacology	Rat Subunit
α	$\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4$	AMPA-selective	GluR1-4, A-D (Heinemann) (Seeburg)
β	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$	Kainate-selective	GluR5, 6, 7 (Heinemann)
γ	$\gamma 1, \gamma 2$	Kainate-selective	KA-1, 2 (Seeburg)
δ	$\delta 1, \delta 2$	Unknown	- - -
ϵ	$\epsilon 1, \epsilon 2, \epsilon 3, \epsilon 4$	NMDA	NR2A, B, C (Seeburg)
ζ	$\zeta 1$	NMDA	NMDAR1 (Nakanishi)

また、 β と γ サブファミリーのサブユニットはカイニン酸型のチャネルを構成します。四種類の ϵ サブユニットは $\zeta 1$ サブユニットと組み合わさって NMDA 受容体チャネルを形成することが解かりました。

これは実は驚きだったのですが、 $\alpha 1$ サブユニット単独で発現させますと、グルタミン酸に反応してチャネルを開き、電流を流すチャネルを形成します(図 4)。この点はアセチルコリン受容体チャネルと大きく異なっています。アセチルコリン受容体チャネルはある意味では

骨格筋の収縮を調節するために完成されたチャネルでありまして、四種類のサブユニットで構成されており、単独のサブユニットではチャネル活性を示しません。ところが中枢の高級であるはずのグルタミン酸受容体チャネルはたった一種類のサブユニットでも活性を示すという、ある意味では原始的な性質を持っていることに驚きました。さらに $\alpha 1$ チャネルはカイニン酸にも AMPA やキスカル酸にも応答することがまた驚きでした。従来言われてきたカイニン酸型や AMPA 型(キスカル酸型)

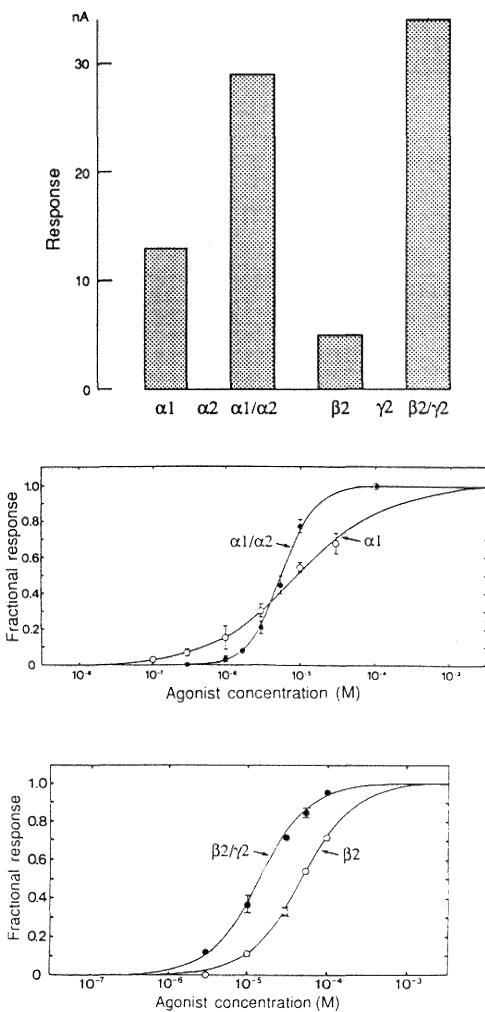


図 4 サブユニットの組み合わせによるグルタミン酸受容体チャネルの形成。左上、 $\alpha 1$ サブユニットと $\alpha 2$ サブユニットならびに $\beta 2$ サブユニットと $\gamma 2$ サブユニットの組み合わせによるグルタミン酸応答の増加。；左下、グルタミン酸に対する濃度一応答曲線。；右上、 $\alpha 1$ チャネルと $\alpha 1/\alpha 2$ チャネルのアゴニストに対する電流応答；右下、 $\beta 2$ チャネルと $\beta 2/\gamma 2$ チャネルのアゴニストに対する電流応答。

の分類に当てはまらないのです。 $\alpha 2$ サブユニットは単独ではほとんど活性を示しませんが、 $\alpha 1$ サブユニットと組み合わせると、大きな電流応答が観察されます。同様に $\beta 2$ サブユニットと $\gamma 2$ サブユニットを組み合わせるとチャンネル活性が大きくなることを見い出しました。

た。実際に二種類のサブユニットが協同してチャンネルを形成していることは、 $\alpha 1$ サブユニットと $\alpha 2$ サブユニットを組み合わせると Hill 係数が増加し、 $\beta 2$ サブユニットと $\gamma 2$ サブユニットを組み合わせるとグルタミン酸に対する親和性が増すことから示唆されます。

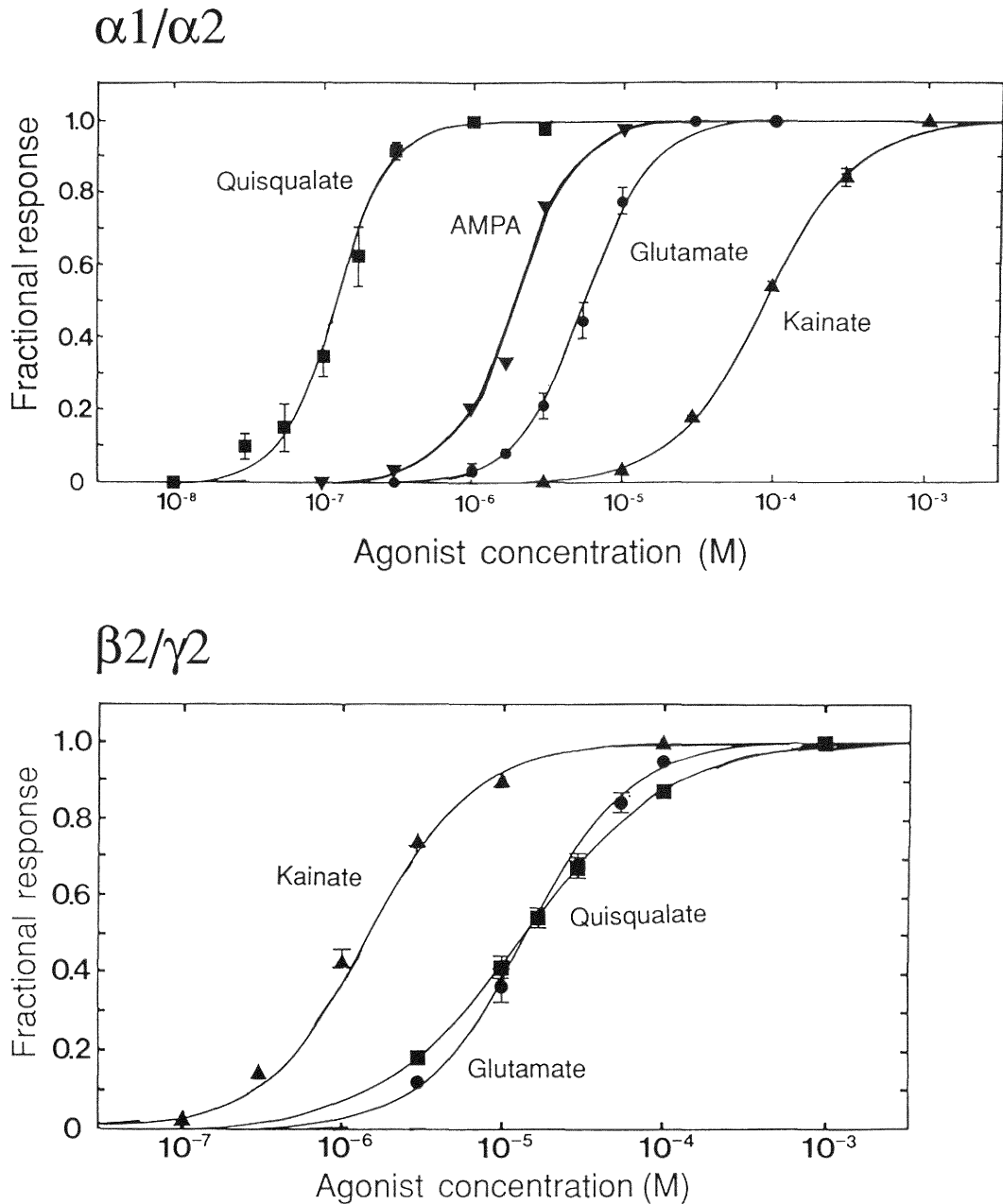
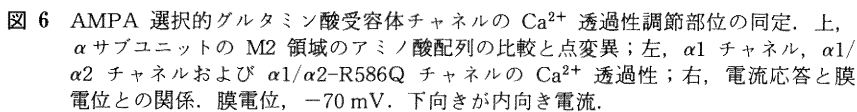


図 5 $\alpha 1/\alpha 2$ チャンネルと $\beta 2/\gamma 2$ チャンネルのアゴニスト選択性。



$\alpha 1/\alpha 2$ チャンネルは、キスカル酸、AMPA、グルタミン酸、カイニン酸のいずれにも応答しますが、キスカル酸と AMPA に親和性が高く、カイニン酸に対しては親和性が低いことが解かりました (図 5)。これに対して $\beta 2/\gamma 2$ チャンネルはカイニン酸に親和性が高く、AMPA に対しては殆ど活性を示しません。したがって従来言われてきた AMPA 受容体チャンネルは、実際はカイニン酸にも応答をしますが AMPA に選択性が高く、我々が α と名付けたサブユニットファミリーにより形成されること、また β サブユニットと γ サブユニット分子がカイニン酸受容体チャンネルを形成することが明らかになりました。

$\alpha 1/\alpha 2$ チャンネルはリンゲル液中、 -70 mV の膜電位で大きな電流応答を示します (図 6)。リンゲル液からナトリウムイオンとカリウムイオンを除くと、応答はなくなり、またカルシウムイオンを添加しても内向き電流応答は観察されません。したがって $\alpha 1/\alpha 2$ チャンネルは、ナトリウムイオンは通すがカルシウムイオンは殆ど通さないと考えられます。この性質は脳の神経細胞に存在する AMPA 型のグルタミン酸受容体チャンネルの性質と非常に良く一致しています。ところが、 $\alpha 1$ サブユニットのみで形成されるチャンネルは、高いカルシウムイオン透過性を有しております。そうすると、同じ AMPA 型受容体なのに一方はカルシウムを通し、一方は通さないのは何故かという疑問が出てきます。

アセチルコリンとの類似性でチャンネルの内壁を形成していると想定した M2 領域のアミノ酸配列を比較すると非常に注目される違いが一箇所あります。この位置

では $\alpha 1$ サブユニットがグルタミンであるのに対し $\alpha 2$ サブユニットでは正電荷を有するアルギニンになっています。グルタミン酸受容体チャンネルはカチオンを通しますから、正電荷を持ったアミノ酸はカチオンと反発して、イオン透過性に大きく影響すると考えられます。M2 領域がチャンネルを形成していると仮定したモデルで考えます。 $\alpha 1$ チャンネルはグルタミンという中性のアミノ酸で形成されています。 $\alpha 1$ チャンネルはナトリウムイオンもカルシウムイオンも透過します。一方、正電荷を持ったアルギニンで構成される $\alpha 2$ チャンネルは殆どイオンを透過しません。また、 $\alpha 1/\alpha 2$ チャンネルはグルタミンとアルギニンの組み合わせで構成され、ナトリウムイオンを通すがカルシウムイオンは通しません。もし我々の仮定が正しければ、このアルギニンをグルタミンに換えればイオンに対する選択性が変わるはずで

$\alpha 1$ サブユニットと遺伝子操作によってアルギニンをグルタミンに置換した $\alpha 2$ サブユニットを組み合わせますと、カルシウムイオンを通すチャンネルが形成されます (図 6)。したがって、AMPA 型グルタミン酸受容体チャンネルのカルシウムイオンの透過性は、 $\alpha 2$ サブユニットにより、さらに $\alpha 2$ サブユニットのたった一個のアミノ酸により決定されているということが明らかになりました。この現象の生理的意義は非常に大きいと考えられます。シスプスの長期増強が見いだされた海馬で、通常のシナプス伝達を担っているのは AMPA/カイニン酸型のグルタミン酸受容体チャンネルです。強い入力刺激があったときに初めて NMDA 型グルタミン酸受容体チャンネルが働いてカルシウムイオンを通します。

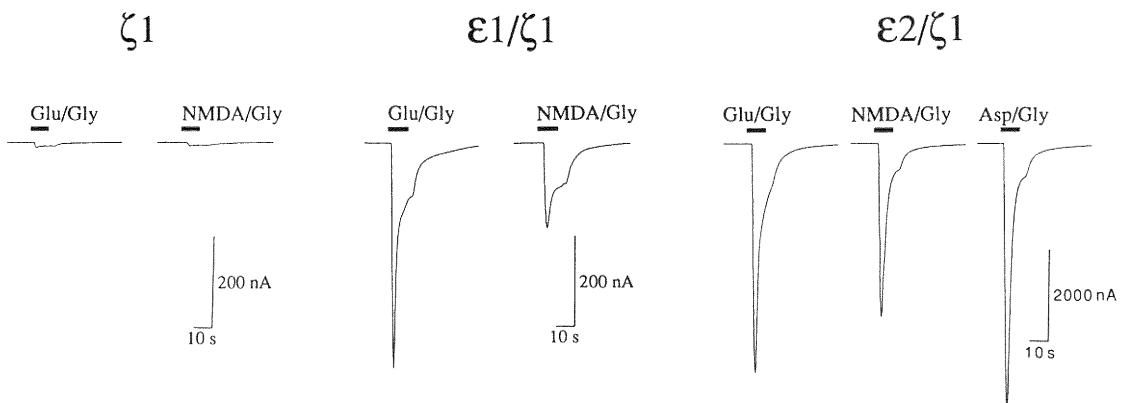


図 7 ϵ サブユニットと ζ サブユニットによる NMDA 受容体チャンネルの形成。 ϵ サブユニットと $\zeta 1$ サブユニットの組み合わせにより NMDA 受容体チャンネル活性が著しく増大する。

カルシウムイオンの流入が引き金になって長期増強を引き起こすわけですから、通常のシナプス伝達を担う AMPA/カイン酸型受容体チャンネルがナトリウムイオンしか通さないのは非常に重要なわけです。

そこでシナプス長期増強の主役である NMDA 受容体チャンネルの話をしていただきます。先に述べましたように NMDA 受容体チャンネルは ϵ サブユニットと ζ サブユニットから構成されるということを見出しました。この二つのサブユニットの一次構造の相同性は18%程度と非常に低く、AMPA 型とかカイン酸型のサブユニットとの相同性と同じくらいです(表1)。 ϵ サブユニットは四種類ありまして、お互い非常によく似たアミノ酸配列を有しています。 ζ 1 サブユニットのみで NMDA とグリシンおよびグルタミン酸とグリシンに応答するチャンネルを形成しますが活性は非常に小さく、 ζ サブユニットと ϵ サブユニットが組み合わさることによって約100倍活性の高いチャンネルが形成されます(図7)。したがって正常な NMDA 受容体チャンネルの形成には我々が発見した ϵ サブユニットが非常に重要だということがわかります。

NMDA 受容体チャンネルは奇妙な性質を持っております。 ϵ 1/ ζ 1 チャンネルにグルタミン酸のみを与えても全く活性がでません。グリシンで少し活性が見られますが、グルタミン酸とグリシンを同時に加えた場合に比べて100

分の1以下の非常に小さな応答です。NMDA 受容体チャンネルはグルタミン酸の受容体だと考えられていますが、実際はグルタミン酸とグリシンの二つのアミノ酸を同時に要求することが明らかになりました。さらに NMDA 受容体チャンネルは、マグネシウムイオンで通常ときには働かないように阻害されており、また抗テンカン剤として開発された MK-801、フェンサイクリジンのような麻酔薬および亜鉛イオンで阻害されることが知られています。また先に述べましたように、グルタミン酸とグリシンの二つのアミノ酸が結合しないとチャンネルが開かないなど、非常に複雑な制御を受ける分子であります。我々がクローニングしてきた二種類のサブユニットを組み合わせますと、APV、7クロロキヌレン酸、マグネシウムイオン、亜鉛イオン、MK-801 などで抑制されるチャンネルが形成される、すなわち NMDA 受容体チャンネルの特徴である複雑な調節を受けるチャンネルが形成されるということが明らかになりました(図8)。また ϵ / ζ チャンネルは高いカルシウムの透過性を示しました。

次に脳内分布を *in situ* hybridization で解析した結果、4種類の ϵ サブユニット mRNA はそれぞれ特徴的な脳内分布を示すことを見出しました(図9)。 ϵ 1 サブユニット mRNA は脳内に広く分布していますが、大脳皮質、海馬、小脳顆粒細胞層に強い発現が認められます。一方、 ϵ 2 サブユニット mRNA は前脳に局在し、

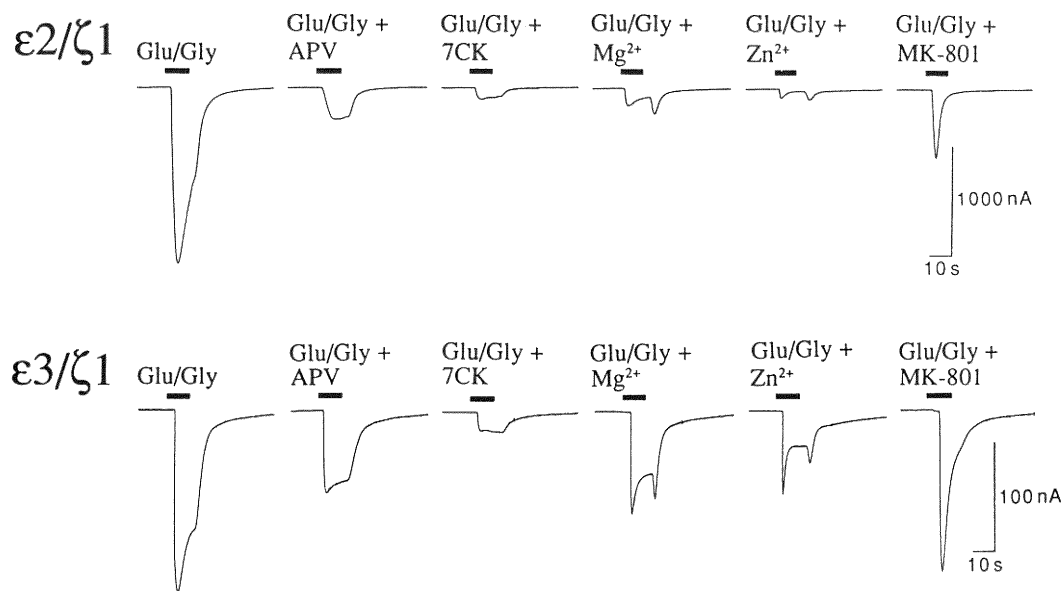


図8 ϵ / ζ チャンネルの薬理学的特性。

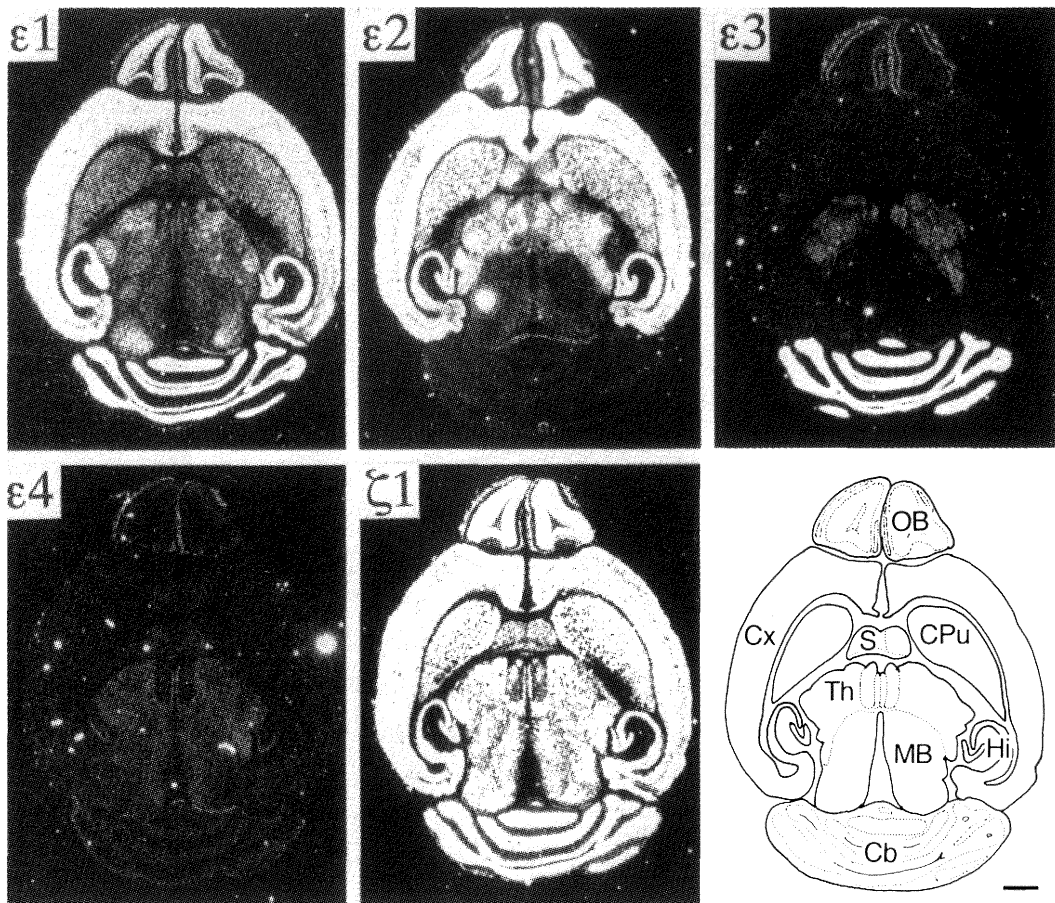


図 9 NMDA 受容体チャネルサブユニット mRNA の脳内分布. 生後21日のマウス脳の水平断面. 上図左, $\epsilon 1$ サブユニット; 上図中央, $\epsilon 2$ サブユニット; 上図右, $\epsilon 3$ サブユニット; 下図左, $\epsilon 4$ サブユニット; 下図中央, $\zeta 1$ サブユニット. OB, 嗅球; Cx, 大脳皮質; Hi, 海馬; CPu, 線条体; S, 中隔; Th, 視床; MB, 中脳; Cb, 小脳. スケール, 1 mm.

嗅球, 大脳皮質, 海馬, 線条体, 視床などに強い発現が観察されます. 逆に, $\epsilon 3$ サブユニット mRNA は, 主に小脳顆粒細胞層で強い発現が認められ, 視床, 嗅球にも弱く発現しています. $\epsilon 4$ サブユニット mRNA は間脳と脳幹部に弱い発現が認められます. $\zeta 1$ サブユニット mRNA は, 大脳皮質, 海馬, 小脳をはじめ脳全体に広く分布しており, 個性的な ϵ サブユニット mRNA の分布とは対照的であります. したがって, NMDA 受容体チャネルの分子構造は脳の部位によって極めて多様であることが予測されます.

さらに ϵ サブユニットの機能的性質を比較しました. $\epsilon 2/\zeta 1$ チャネルおよび $\epsilon 3/\zeta 1$ チャネルは $\epsilon 1/\zeta 1$ チャ

ネルに比べて, グルタミン酸およびグリシンに対する親和性が高いことがわかりました (図 10). APV に対しては $\epsilon 1/\zeta 1$ チャネルが一番感受性が高い. それに対しては, 7クロロキヌレン酸に対しては $\epsilon 3/\zeta 1$ チャネルが感受性が高い (図 11). したがって, 今まで NMDA 受容体チャネルとして考えられていたものが, 実は性質が異なる幾つかのサブタイプから成っていること, すなわち NMDA 受容体チャネルには多様性があるということが明らかになってまいりました.

それからもう一つの面白い発見は, $\epsilon 1/\zeta 1$ チャネルおよび $\epsilon 2/\zeta 1$ チャネル活性が西塚先生が見つけれられてこられた蛋白質リン酸化酵素Cの活性化剤である TPA

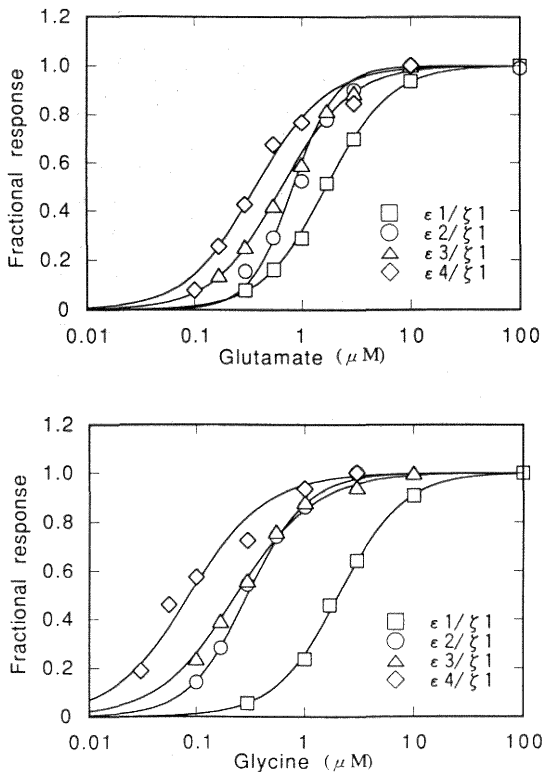


図 10 NMDA 受容体チャネルのグルタミン酸およびグリシンに対する濃度一応答曲線。

で処理することにより約3倍に増強されることです(図12)。蛋白質リン酸化酵素の阻害剤であるスタウロsporinでTPAの影響がなくなりますから、TPAの作用は特異的であると考えられます。さらに $\epsilon 3/\zeta 1$ チャネルの活性はTPAの処理で増強されないことから、おそらく生理的意味のある発見だろうと推察されます。そういたしますと非常に重要な可能性が考えられます。NMDA受容体チャネルは、シナプス可塑性の引き金になる非常に大事な機能を担っており、その活性が蛋白質リン酸化酵素によって正に制御されている可能性が指摘されたわけです。すなわち様々な刺激、たとえばG蛋白共役型受容体を活性化するような入力により、蛋白質リン酸化酵素が活性化されると、NMDA受容体チャネルの活性が変化する可能性があります(図13)。NMDA受容体チャネルはシナプスの長期増強の引き金になっているわけですから、様々な刺激入力によりシナプス可塑性誘導のいき値が調節され得るということであり、我々の考えておりますのはこのような調節機構によってNMDA

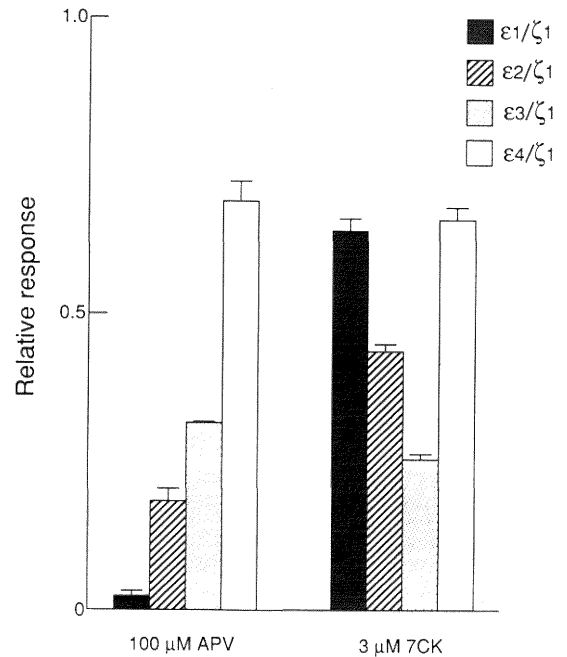


図 11 NMDA 受容体チャネルの APV および 7-クロロキスレン酸 (7CK) に対する感受性の差異。

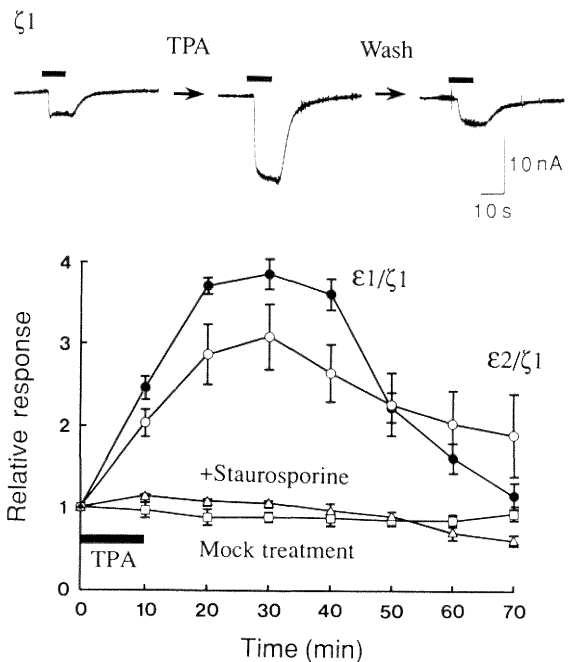


図 12 TPA 処理による NMDA 受容体チャネルの活性化。10分間の TPA 処理による $\zeta 1$ チャネル、 $\epsilon 1/\zeta 1$ チャネルおよび $\epsilon 2/\zeta 1$ チャネルの活性化。

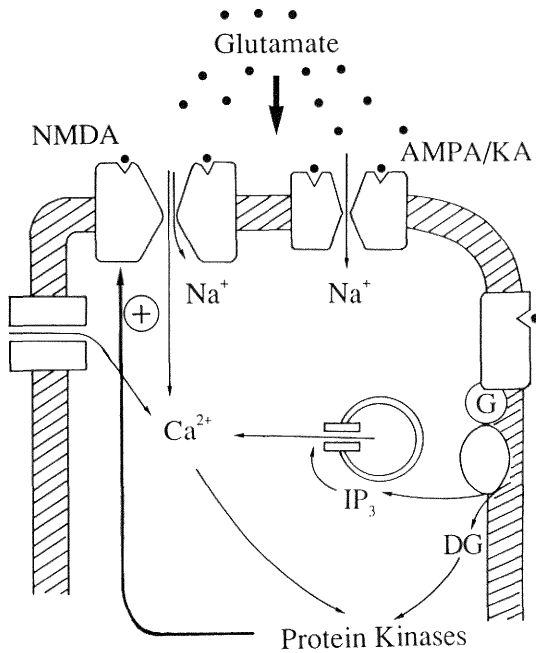


図 13 G 蛋白共役型神経伝達物質受容体を介した入力や Ca^{2+} 流入など蛋白質磷酸化酵素を活性化するような刺激は、NMDA 受容体チャネルの活性を増強することによりシナプス長期増強のいき値を調節している可能性が考えられる。

受容体チャネルの活性を高めておいてやれば、現在生理の実験に使われているような非常に強いテタヌ刺激でなくて、実際に脳で作用しているような入力でもシナプス可塑性が誘導されるのではないかという可能性であります。

$\epsilon 3$ サブユニットの興味深い性質はマグネシウムイオンに対する感受性が低いことです (図 14)。1 mM という生理的濃度のマグネシウムイオンで $\epsilon 1/\zeta 1$ チャネルおよび $\epsilon 2/\zeta 1$ チャネルはほぼ完全に抑制されます。ところが $\epsilon 3/\zeta 1$ チャネルは抑制はかかりますがその程度は完全ではありません。したがって、生理的濃度のマグネシウムイオン存在下で $\epsilon 3/\zeta 1$ チャネルは働き得ることが予想されます。 $\epsilon 3$ サブユニット mRNA は小脳の顆粒細胞に局在していると考え合わせると、 $\epsilon 3$ サブユニットは苔状繊維から顆粒細胞への神経情報の伝達に参与する NMDA 受容体チャネルを構成していることが推定されます。以上の知見から、 ϵ サブユニットの分子的多様性が、機能的に多様な NMDA 受容体チャネルが形成される基盤となっていることが示唆され

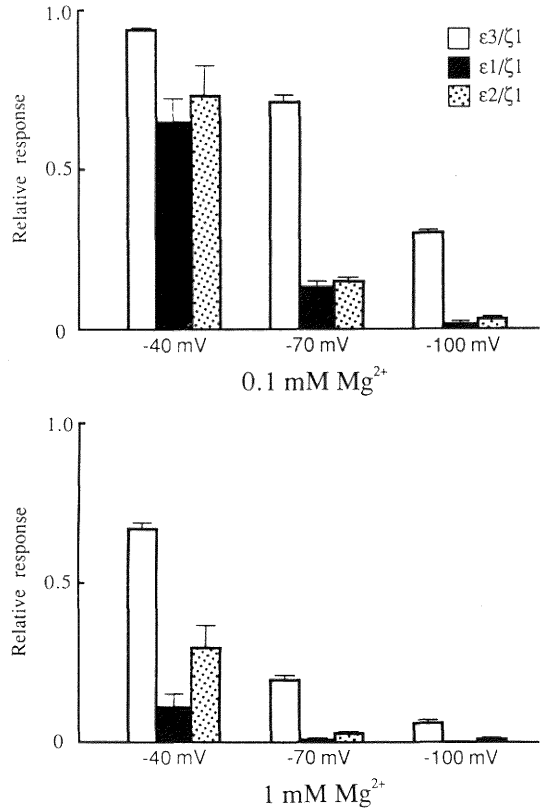


図 14 NMDA 受容体チャネルの Mg^{2+} 感受性の差異。

ます。

次に機能的に重要なマグネシウムイオンによる閉塞阻害の機構について考えてみます。先に述べましたように M2 領域の一個のアミノ酸残基によって AMPA 選択的グルタミン酸受容体チャネルのカルシウムイオン透過性が決定されていることを明らかにしたのですが、NMDA 受容体チャネルを構成する全てのサブユニットにおいてその部位に相当するアミノ酸はアスパラギンであります (図 2)。もしグルタミン酸受容体チャネルのファミリーが似たような構造をとっているのであれば、このアミノ酸残基もチャネル機能に重要な働きをしている可能性があると考え、アスパラギンを炭素鎖が一個違うだけのよく似たグルタミンに変換し、その影響を解析しました (図 15)。

我々の予想はよく当たりました。 $\epsilon 2/\zeta 1$ チャネルはマグネシウムイオンあるいは亜鉛イオンできれいに阻害がかかります。しかし $\zeta 1$ サブユニットのアスパラギンをグルタミンに換えますと、マグネシウムイオンによ

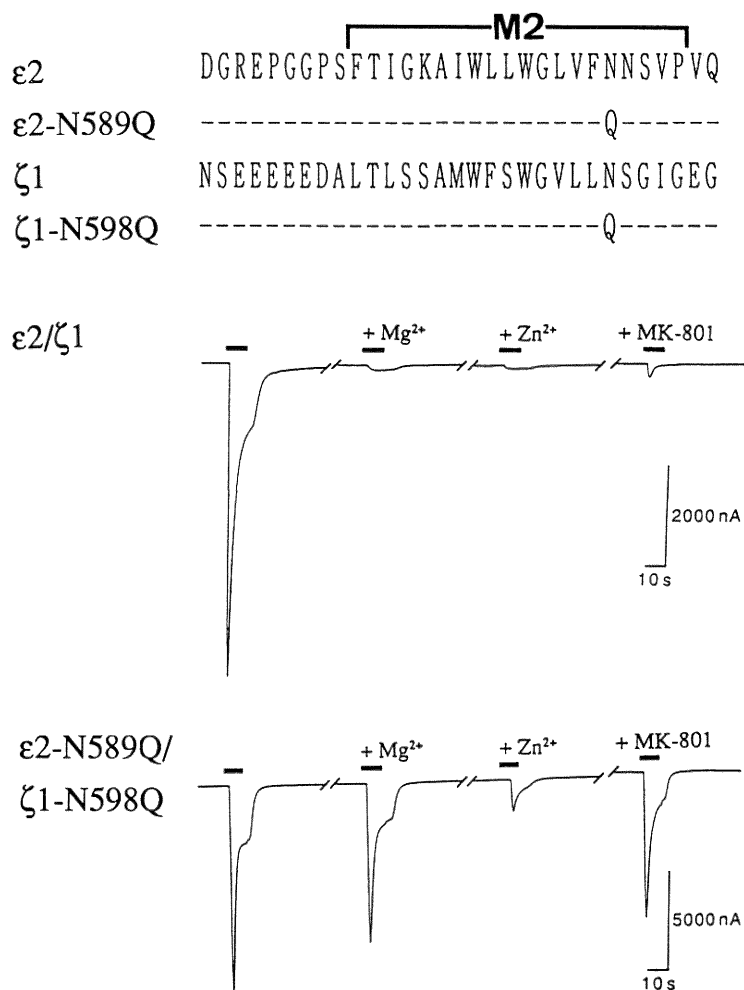


図 15 NMDA 受容体チャネルの Mg^{2+} 閉塞阻害部位の同定. 上, $\epsilon 2$ サブユニットと $\zeta 1$ サブユニットの M2 領域のアミノ酸配列と置換変異; 下, アスパラギン残基の置換変異が Mg^{2+} , Zn^{2+} , MK-801 感受性に及ぼす影響. 膜電位 -70 mV . Frog Ringer 液中で測定.

る阻害の程度が小さくなります。さらに $\epsilon 2$ サブユニットにも $\zeta 1$ サブユニットにも同じ部位に点変異を導入いたしますとマグネシウムイオンによる阻害がほとんどかからなくなりました。さらに、チャネルブロッカーである MK-801 によってもほとんど阻害されなくなりました。もう少し定量的なデータをお見せいたします。 $\epsilon 2/\zeta 1$ チャネルは生理的濃度のマグネシウムイオンで完全に阻害されるのに対し、変異を導入したチャネルはいずれもマグネシウムイオンに対する感受性が約 100 倍低くなっています (図 16)。MK-801 に対しては両方のサ

ブユニットに変異を入れると抵抗性のチャネルになります (図 17)。亜鉛イオンに対する感受性は、変異によって多少弱くなる程度で、大きな変化は認められません。したがってマグネシウムイオンと亜鉛イオンの作用部位は明らかに異なることが示されます。以上の結果から、生理的に非常に重要なマグネシウムイオンによる閉塞阻害が NMDA 受容体チャネルのたった一個のアミノ酸、アスパラギンで決定されていることが示されました。

海馬の CA3 野から CA1 野への伝達を考えてみます。AMPA 選択的 $\alpha 1/\alpha 2$ チャネルはグルタミンとアルギ

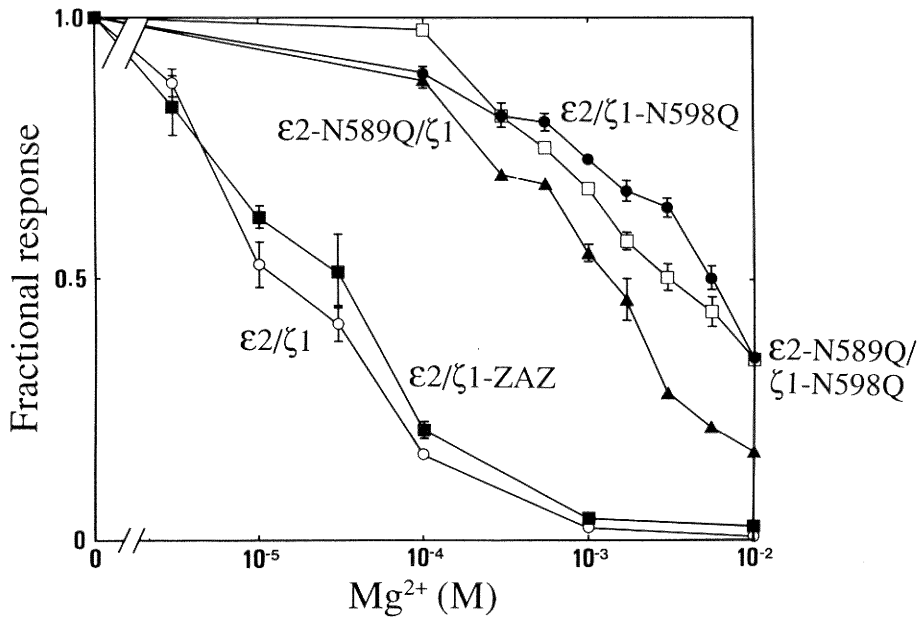


図 16 置換変異が NMDA 受容体チャネルの Mg^{2+} 感受性に及ぼす影響。膜電位 -70 mV ; Ca^{2+} 流入によって引き起こされる二次的な Ca^{2+} 依存性 Cl^{-} チャネルの影響を極力除外するため、 Ca^{2+} を Ba^{2+} に置き換えた Ringer 液を用いている。

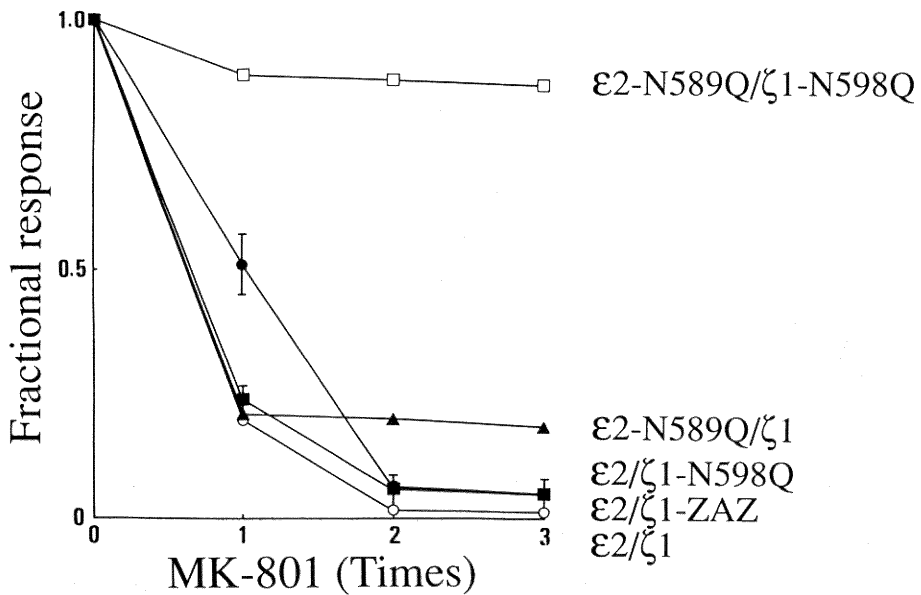


図 17 置換変異が NMDA 受容体チャネルの MK-801 感受性に及ぼす影響。膜電位 -70 mV ; Ba^{2+} Ringer 液。

ニンの組み合わせでナトリウムイオンしか通さないようなチャンネルを形成しています。この位置に対応する NMDA 受容体チャンネルのアミノ酸はアスパラギンで、マグネシウムイオンで阻害されるチャンネルを形成しているわけです。非常に強い刺激が入ってくると、シナプス後細胞の興奮によってマグネシウムイオンの閉塞阻害が外れて、NMDA 受容体チャンネルのアスパラギンがカルシウムイオンもナトリウムイオンも通すチャンネルを形成している。したがって AMPA 型のチャンネルと NMDA 型のチャンネルとはその生理的機能が大きく異なるのですが、これらのチャンネルの性質を決めている基本原理というのは非常によく似ているということが示されます。さらに生理機能と密接に関係しているチャンネルの性質が、たった一個のアミノ酸で支配されているというのは非常に驚きでありました。

我々はシナプスの可塑性に非常に重要だと考えられている NMDA 受容体チャンネルを分子として単離することに成功いたしました。今後、この重要な分子をもとに、記憶・学習という脳の高次機能にどのようにアプローチしていくかということが非常に大切になってきます。現在非常に有力だと思われる方法論の一つは、分子を出発点としてもう一度個体レベルまで戻るといことです。

具体的にはジーンターゲットングをはじめとするトランスジェニック動物の手法を用いて、機能的に重要な分子に様々な変異をきたした動物個体を作り出し、その個体の記憶・学習、脳の形成、あるいは脳疾患を探索する、すなわち分子から個体へ戻って研究するという方法がこれから非常に大事になると考えております。

二年間本研究所でやってまいりまして思ったことは、研究というのは人が大事である、また研究というのはやる気が大事だということです。したがって、最後に研究室で実際に研究をした人達を少し時間を頂いて紹介したいと思います(図 18, 19)。ここにいるのが一番最初に一緒に仕事をやりだした助教授の崎村君です。彼は我々の研究室で電気生理のシステムを動かし、 α 、 β および γ サブユニットをクローニングし、さらに現在トランスジェニックマウスに取り組んでおります。それから一年前から参加してくれました助手の森君はマグネシウム閉塞阻害部位を同定しました。技官の荒木君は ϵ サブユニットを単離した目黒君と δ サブユニットを見つけてきた山崎雅俊君、 ζ サブユニットをクローニングした山崎誠君の面倒を見て、多くの新しい分子を発見しました。技官の櫛谷さんは *in situ* hybridization によりサブユニットの脳内分布を明らかにしました。轡田君が前脳の



図 18 神経薬理学部門の教室員(平成3年7月)。

$\epsilon 2$ サブユニットを、柏淵さんが小脳 $\epsilon 3$ サブユニットを、森田君が $\beta 2$ サブユニットをクローニングいたしました。池田君、永沢君、柁木君、山倉君も新しいプロジェクトに取り組んでいるのが現状です。どうも御静聴ありがとうございました。

参 考 文 献

- 1) Sakimura, K., Bujo, H., Kushiya, E., Araki, K., Yamazaki, M., Yamazaki, M., Meguro, H., Warashina, A., Numa, S. and Mishina, M. (1990): Functional expression from cloned cDNAs of glutamate receptor species responsive to kainate and quisqualate. *FEBS Lett.* 272, 73~80.
- 2) Mishina, M., Sakimura, K., Mori, H., Kushiya, E., Harabayashi, M., Uchino, S. and Nagahari, K. (1991): A single amino acid residue determines the Ca^{2+} permeability of AMPA-selective glutamate receptor channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 813~821.
- 3) Mishina, M., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Yamazaki, M., Yamazaki, M. and Meguro, H. (1991): Structure and function of acetylcholine and glutamate receptors, in "Neurotransmitter regulation of gene transcription" Fidia Research Foundation Symposium 7, 133~142.
- 4) Kawamoto, S., Onishi, H., Hattori, S., Miyagi, Y., Amaya, Y., Mishina, M. and Okuda, K.: Functional expression of the $\alpha 1$ subunit of the AMPA-selective glutamate receptor channel, using a Baculovirus system (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 756~763.
- 5) Morita, T., Sakimura, K., Kushiya, E., Yamazaki, M., Meguro, H., Araki, K., Abe, T., Mori, K.J. and Mishina, M. (1992): Cloning and functional expression of cDNA encoding the mouse $\beta 2$ subunit of the kainate-selective glutamate receptor channel. *Mol. Brain Res.* 14, 143~146.
- 6) Sakimura, K., Morita, T., Kushiya, E. and Mishina, M. (1992): Primary structure and expression of the $\gamma 2$ subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate. *Neuron* 8, 267~274.
- 7) Yamazaki, M., Mori, H., Araki, K., Mori, K.J.



図 19 神経薬理学部門の教職員 (平成4年5月)。

- and Mishina, M. (1992): Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit. FEBS Lett. 300, 39~45.
- 8) Yamazaki, M., Araki, K., Shibata, A. and Mishina, M. (1992): Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. Biochem. Biophys. Res. Commun. 182, 886~892.
- 9) Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M. and Mishina, M. (1992): Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. Nature 357, 70~74.
- 10) Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. and Mishina, M. (1992): Molecular diversity of the NMDA receptor channel. Nature 358, 36~41.
- 11) Mori, H., Masaki, H., Yamakura, T. and Mishina, M. (1992): Identification by mutagenesis of a Mg^{2+} block site of the NMDA receptor channel. Nature 358, 673~675.
- 12) Uchino, S., Sakimura, K., Nagahari, K. and Mishina, M. (1992): Mutations in a putative agonist binding region of the AMPA-selective glutamate receptor channel. FEBS Lett. 308, 253~257.
- 13) Mishina, M., Sakimura, K., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Yamazaki, M., Yamazaki, M., Meguro, H. and Morita, T. (1992): Structure and function of the AMPA-selective glutamate receptor channel, in "Frontiers and horizons in amino acid research" (Takai, K. ed.), p.223~230, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- 14) Mishina, M., Sakimura, K., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Meguro, H., Morita, T., Kutsuwada, T. and Kashiwabuchi, N. (1992): Molecular diversity and function of the glutamate receptor channel, in "Neurotransmitter receptors and intracellular signaling" (Yoshida, H. and Ui, M. eds.), p.3~16, Excerpta Medica, Tokyo.
- 15) Ikeda, K., Nagasawa, M., Mori, H., Araki, K., Sakimura, K., Watanabe, M., Inoue, Y. and Mishina, M. (1992): Cloning and expression of the $\epsilon 4$ subunit of the NMDA receptor channel. FEBS Lett. 313, 34~38.
- 16) Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. and Mishina, M. (1992): Developmental changes in distribution of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brain. NeuroReport 3, 1138~1140.
- 17) 三品昌美: 「アセチルコリン受容体の構造と機能」, 神経研究の進歩, 第34巻, p.911~919, 1990.
- 18) 三品昌美: 「神経情報の伝達」, 分子生物科学, 第10巻, p.91~116, 1991, 岩波書店.
- 19) 崎村建司, 三品昌美: 「グルタミン酸受容体チャネルの構造と機能」, 実験医学, 第9巻, p.579~584, 1991.
- 20) 三品昌美: 「グルタミン酸レセプターチャネルの分子的多様性と機能」, 実験医学, 第10巻, p.36~42, 1992.