

受賞者講演

代謝活性型グルタミン酸受容体： リガンドの開発と嗅覚情報伝達での役割の解明

林 康 紀

要約：代謝活性型（メタボトロピック型）グルタミン酸受容体（mGluR）には8つのサブタイプが存在するが、それぞれの機能については特異的なリガンドの欠如もあり不明な点が多かった。この一連の研究では、種々のグルタミン酸アナログの mGluR のリガンドとしての活性を、各サブタイプを発現した細胞株のセカンドメッセンジャーを測定することで検討した。その結果、(2*S*, 1'*R*, 2'*R*, 3'*R*)-2-(2,3-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG-IV) がサブグループ II の特異的なアゴニスト、(+)- α -methyl-4-carboxyphenylglycine (α M4CPG) が mGluR1 と mGluR2 の両者に対するアンタゴニストとして同定された。次に DCG-IV を用い、mGluR2 が副嗅球樹状突起間シナプスにおいて顆粒細胞からの GABA の放出をシナプス前性に抑制していることを見出した。この機構により僧帽細胞が GABA による抑制から解除され、周辺の僧帽細胞への側方抑制をかけると考えられた。また、雌マウスの副嗅球に DCG-IV を注入することで、mGluR2 の活性化が妊娠阻止現象にて観察されるのと同様の嗅覚の記憶を引き起した。この一連の研究は中枢神経に於ける特定の mGluR サブタイプの機能を明らかにした初めてのものである。

1. はじめに：代謝活性型グルタミン酸受容体とは

グルタミン酸受容体は、イオンチャネル型、代謝活性型の2つのグループに大別される。イオンチャネル型グルタミン酸受容体は、グルタミン酸の結合により陽イオンチャネルを開口する。その薬理学・生理学的な差違により、N-

methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型受容体、カニン酸型受容体（後二者を纏めて non-NMDA 型受容体という）の3つに細分類される。

一方、かつてからグルタミン酸刺激が、神経初代培養や脳由来の mRNA を発現したアフリカツメガエル卵母細胞で IP_3/Ca^{2+} 系を刺激することが知られ(1, 2)、代謝活性型グルタミン酸受容体 (mGluR) と呼ばれていた。樹らはこれをアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いクローニングし、7回膜貫通型 G タンパクに共役する受容体であることを示した(3)。ところがこの受容体は、それまで知られてきたロドプシン型受容体とは明らかなホモロジーが無く、全く新しい範疇の受容体であることが判った。その後 cross hybridization 法、PCR 法により全部で8種類の mGluR がこれまでに見出されている(4)。

表1はこれまで同定されている8つの mGluR の薬理的・生化学的特性と主な分布パターンをまとめた(4)。8つは薬理学的特性と共役する細胞内セカンドメッセンジャーによりサブグループ I から III に細分される。サブグループ I (mGluR1, 5) は、イノシトールリン酸代謝回転と細胞内 Ca^{2+} の上昇を引き起し、またキスカル酸に対して最も親和性が高い。一方、サブグループ II (mGluR2, 3) と III (mGluR4, 6, 7, 8) はいずれも cAMP 抑制系に働くが、サブグループ II は (\pm)-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylic acid (tACPD) が高親和性アゴニストであるのに対しサブグループ III は L(+)-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4) が高親和性アゴニストである。以上のように、mGluR は分子そのものとしても、また機能的にも当初には予想されなかった多様性を示す事が判った。

2. mGluR サブタイプに特異的なリガンドの検索

ところが、この様に分子生物学的な同定が先行したが、薬理的なツールの検索は遅れていた。特に拮抗薬は研究

キーワード：代謝活性型グルタミン酸受容体、
グルタミン酸誘導体、リガンド、
構造活性相関、嗅覚

Cold Spring Harbor Laboratory, Jones Building
(1 Bungtown Road, Cold Spring Harbor, NY 11724,
USA)

原稿受理日：1998年11月14日

第13回日本薬理学会学術奨励賞受賞講演総説

Table 1 Summary of mGluR family

Subgroup I	IP ₃ /Ca ²⁺	Quisqualate > L-Glutamate ≥ Ibotenate > L-CCG-I ≈ tACPD
mGluR1	1199 aa	CA2, CA3, Purkinje cell, Olfactory mitral cell
mGluR5	1171 aa	CA1, CA2, CA3, Olfactory granule cell
Subgroup II	cAMP ↓	DCG-IV ≈ L-CCG-I > L-Glutamate ≈ tACPD > Ibotenate
mGluR2	872 aa	Dentate gyrus, Cerebellar Golgi cell, Accessory olfactory bulb
mGluR3	879 aa	Cerebral cortex, Retinothalamic nucleus (both neurons and glia cells)
Subgroup III	cAMP ↓	L-AP4 > L-Glutamate ≫ tACPD
mGluR4	912 aa	Cerebellar granule cell, Olfactory granule cell
mGluR6	871 aa	Retinal bipolar cell
mGluR7	915 aa	Wide distribution
mGluR8	908 aa	Olfactory bulb, Retina, Mammillary body

Second messenger system, number of amino acids, main distribution in brain and pharmacological profiles are shown. L-CCG-I, (2S, 1'S, 2'S)-2-(carboxycyclopropyl)glycine; DCG-IV, (2S, 1'R, 2'R, 3'R)-2-(2,3-dicarboxycyclopropyl)glycine; tACPD, (±)-1-aminocyclopentane-*trans*-1,3-dicarboxylic acid, L-AP4, L(+)-2-amino-4-phosphonobutyrate

を解析した時点では得られず、中枢神経系での mGluR の機能解析を行う上で大きな障害となっていた。そこで、筆者らは mGluR に対する新規リガンドの開発に着手した。中枢神経系に於ける機能が判っていない受容体を効率よく検索するために、各サブグループから mGluR1, mGluR2, mGluR4 または mGluR6 を選び、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に遺伝子導入した細胞株を樹立した(5~8)。また、活性は mGluR1 はイノシトールリン酸代謝回転、mGluR2, mGluR4, mGluR6 はフォスコリンによる細胞内 cAMP レベルの亢進により測定した。当初、結合実験によりスクリーニングすることを検討したが、利用できる放射性リガンドが³H-グルタミン酸のみしかなく、CHO 細胞やその他の細胞株ではトランスポーターと思われる内在性の結合が多く遺伝子を導入した細胞に特異的な結合の検出が出来なかった。このように受容体を恒常的に発現する細胞株を使用することで、サブタイプ特異性を含めたりリガンドの活性の検索が、効率よく可能となった。

(1) カルボキシシクロプロピルグリシン誘導体の検索

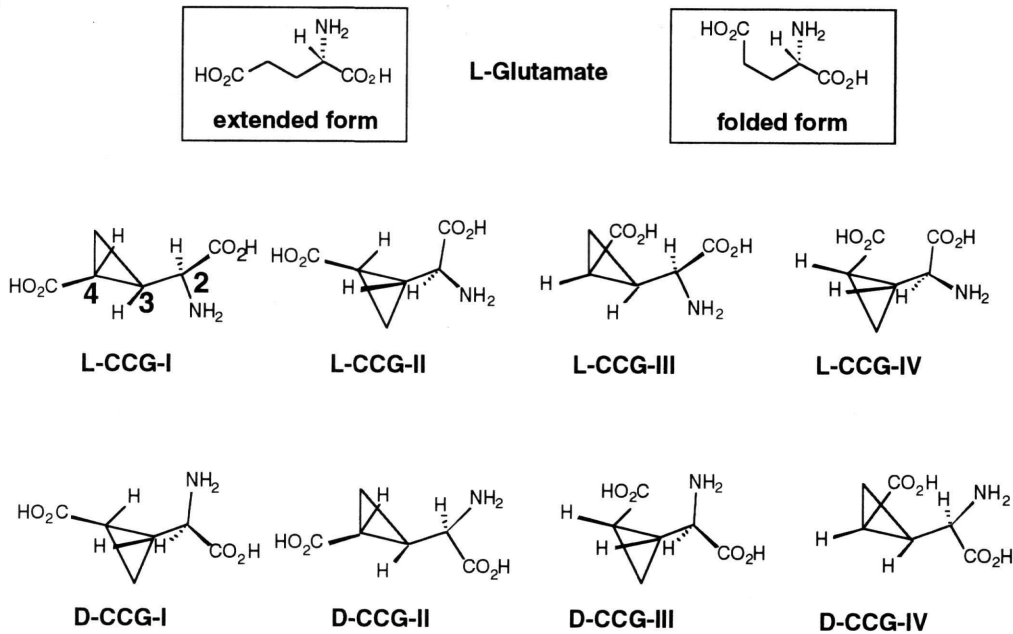
カルボキシシクロプロピルグリシン (CCG) 誘導体は、図 1a の構造を持つ一連のグルタミン酸誘導体であり、2 位、3 位、4 位の 3 つの不斉炭素を持つことから全部で 8 つの立体異性体が可能である。2-3 位、3-4 位の炭素間の単結合が様々な配座を取り得るグルタミン酸と比較する

と、CCG 誘導体は 3-4 位の炭素間がシクロプロピル環の一部になることで固定されている。その為、CCG 誘導体はグルタミン酸の配座を固定した分子と考えることが出来る。特に CCG-I と CCG-II は、 α -carbon と ω -anionic group が離れていることから extended form、CCG-III と CCG-IV は両者が近接していることから folded form とも言われる。

大船らはこれらの異性体を合成し(9,10)、篠崎、石田らはそれらの活性を新生ラット脊髄摘出標本において検討した(11,12)。その結果、D-CCG-II, L-CCG-IV が NMDA 受容体の作動薬、L-CCG-III がグルタミン酸トランスポーターの阻害薬と考えられた。ところが、L-CCG-I は脊髄前根の脱分極を引き起すものの、NMDA 受容体、non-NMDA 型受容体の拮抗薬では完全には抑制されなかった。彼らはこの点を更に追求し、培養ニューロンで、L-CCG-I がイノシトールリン酸代謝回転を引き起こすこと(13)、脳由来 mRNA を注入したアフリカツメガエル卵母細胞において L-CCG-I が Ca²⁺ 依存性の振動性の Cl⁻ 電流を惹起すること(14) から mGluR を活性化していると考えた。これは、クローニングされた受容体に照らし合せて考えるとサブグループ I 受容体の活性を見ていると考えられる。

われわれは、大船らより CCG 誘導体の供与を受け mGluR1, mGluR2, mGluR4 に対する活性を検討した(図

a



b

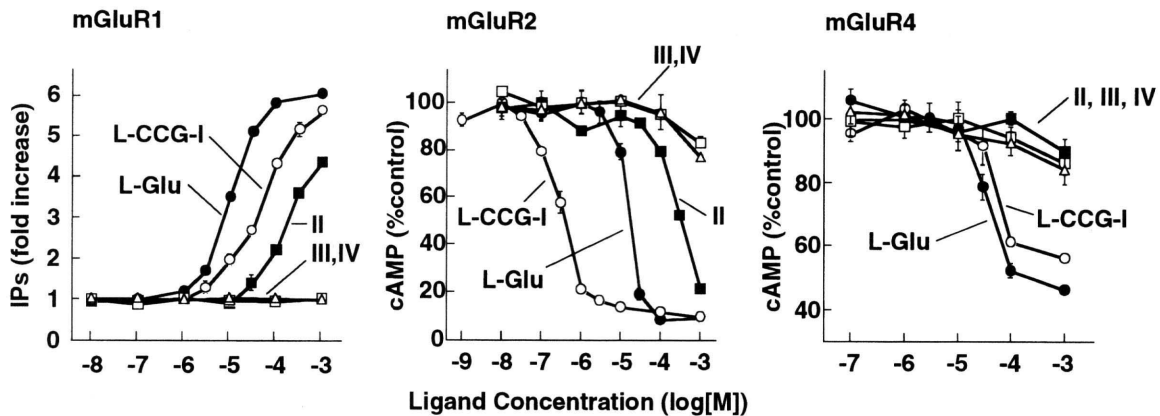


Fig. 1 Agonist activities of carboxycyclopropylglycine isomers on mGluRs. a: Structures of carboxycyclopropylglycine (CCG) isomers. CCG isomers can be considered as conformationally fixed analogues of glutamate. Based on the distance between the α -carbon moiety and ω -anionic group, CCG isomers mimic either extended or folded forms of L-glutamate. b: Activities of L-CCG isomers on three different metabotropic glutamate receptors, mGluR1, mGluR2, and mGluR4, expressed individually in CHO cells. For mGluR1, the total inositol phosphates formation and for mGluR2 and mGluR4, the inhibition of forskolin-stimulated cAMP formation was determined.

1b) (15). その結果, CCG 誘導体のそれぞれの異性体の活性はそれぞれの受容体サブタイプに対し異なることが判った. L-CCG-Iはどのサブタイプに対しても作動薬活性があった. mGluR1に対するEC50は, 5×10^{-5} Mとグル

タミン酸そのものより弱い作動薬, mGluR4に対してはグルタミン酸と同程度の活性を持つ作動薬であった. ところが, mGluR2に対しては, EC50が 3×10^{-7} Mとグルタミン酸自体より一桁以上低濃度であった. また Kawaiら

はL-CCG-Iはイオンチャネル型グルタミン酸受容体には殆ど作用しない事を報告している(16)。以上よりL-CCG-Iを適当な濃度、例えば 3×10^{-6} M程度を使用することでmGluR2(ここでは検討していないがおそらくもう一つのサブグループIIのmGluRであるmGluR3も)を特異的に刺激できるのではないかと考えられた。一方、L-CCG-IIもmGluR1とmGluR2に作動薬活性を示したが、それらは弱いものであった。その他の誘導体には作動薬、阻害薬活性いずれも見出されなかった。

構造活性相関を考えるとL-CCG-I, L-CCG-IIのいずれもL体であり、D体のCCG誘導体の中には活性を示すものはなかった。この点、D体のアミノ酸であるD-CCG-II, NMDAやD-AP5にも反応するNMDA型受容体とは異なっている。また、両者ともextended formであり、folded formであるCCG-III, CCG-IVはL体、D体ともにmGluRには反応しなかった。L-CCG-IとL-CCG-IIは同じL体のextended formであるのに関わらず活性に差があったが、これはシクロプロピル環の方向が異なるため受容体タンパクと立体障害を起している可能性、または、 α -carbonと ω -anionic groupの距離や角度に影響を与えている可能性が考えられる。

(2) ジカルボキシシクロプロピルグリシン誘導体

L-CCG-IがmGluRの作動薬であることが判ったため、CCGをリード化合物としてさらに有用なmGluRのリガンドの検索を行った。その結果見出されたのが、2つのジカルボキシシクロプロピルグリシン異性体、DCG-IIIとDCG-IVである(17,18)。この両者はCCGのシクロプロピル環の3つの炭素の残る1つにもう一つカルボキシル基を付加した構造になっている。興味深いことにいずれもextended form, folded form 2つのグルタミン酸を1つの分子内に持っている構造と考えられ、DCG-IIIはL-CCG-IIとL-CCG-III, DCG-IVはL-CCG-IとL-CCG-IVとのハイブリッド分子とも言うことが出来る(図2a)。

DCG異性体の活性を図2bに示す(18,および未発表データ)。特に注目すべきなのはDCG-IVである。この化合物はmGluR1, mGluR4には殆ど活性を示さなかったが、mGluR2とmGluR3に対してはリード化合物であるL-CCG-Iと同程度の活性($EC_{50} = 3 \times 10^{-7}$ M)を示し、サブグループIIに非常に特異的な作動薬であることが示唆された。次にNMDA型受容体, non-NMDA型受容体に対する活性を $[^3H]$ -3-((RS)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid(CPP), $[^3H]$ -AMPA, $[^3H]$ -カイニン酸の脳膜画分に対する結合により検討したところ、non-NMDA受容体には作用しないが、NMDA型受容体に作用することが判った。アフリカツメガエル卵母細胞で発現したNMDA受容体NR1サブユニットに対しては作

動薬としての活性として働きその EC_{50} 値は約 3×10^{-5} Mであった。Wilch(19)ら、Uyama(20)らも電気生理学的にニューロン内在性のNMDA受容体で同様な作動薬活性を示している。その為、DCG-IVを使用するときには低濃度(例えば 10^{-6} M)で使用し、またNMDA受容体阻害薬を併用するか別にコントロールを取る必要がある。

(3) フェニルグリシン誘導体

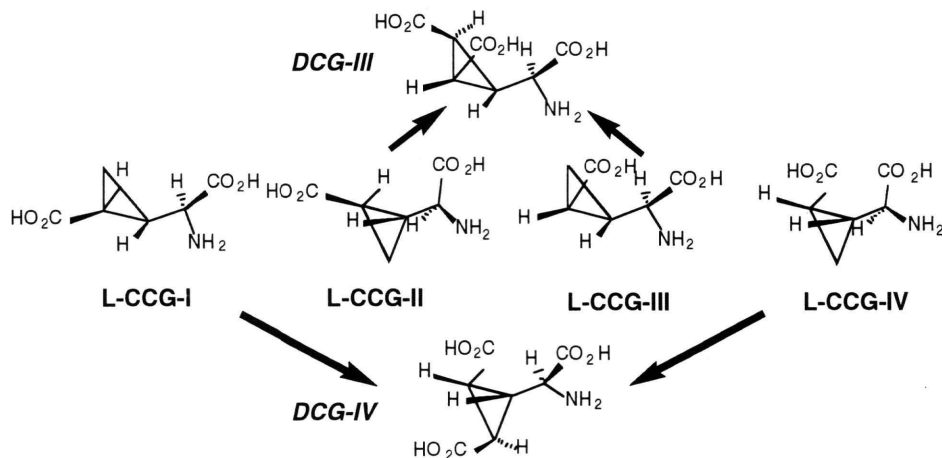
Watkinsらは新生ラット脊髄摘出標本を用い、4-carboxy-3-hydroxyphenylglycine(4C3HPG)にサブグループIと考えられるmGluRに拮抗作用があることを示した(21,22)。一方、伊藤らは脳由来mRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞で3,5-dihydroxyphenylglycineに同じくサブグループIと考えられるmGluRに作動薬活性があることを示した(23)。両者の化合物ともphenylglycine骨格を持っており、phenylglycineが有用なリード化合物となり得る可能性を示している。われわれはWatkinsらが合成した一連のphenylglycine誘導体の供与を受け、CHO細胞にてその活性を検討した(表2)(24,25)。

その結果、当初見出された4C3HPGにはmGluR2に対する作動薬活性があり、リガンドとしては使用しにくいことが判った(24)。しかしながら α M4CPG(最近ではMCPGと略されることも多い)にmGluR1, mGluR2両者に対する阻害薬活性が見出された(24)。Schild plotを行うと、mGluR1に対する pA_2 値は4.38、傾きは0.94、mGluR2に対してはそれぞれ4.29, 0.891であり拮抗阻害薬であると考えられた(24)。MCPGはmGluRに対して初めて見出された拮抗阻害薬であり、今日では幅広く使われている。しかしながら、親和性が低く高濃度(1 mM以上)で使用しなければならず更に高親和性、かつサブタイプ特異的な阻害薬の登場が待たれる。

(4) MCCG-I, MAP4

ところで、 α M4CPGとその α -methyl基がない形である4-carboxyphenylglycine(4CPG)とを比較すると、 α -methyl基の付加がmGluR2の作動薬を阻害薬とするように決定づけているように見える(表2)(24,25)。同様な関係が、4C3HPGと α -methyl-4-carboxy-3-hydroxyphenylglycineおよび3-carboxy-4-hydroxyphenylglycineと α -methyl-3-carboxy-4-hydroxyphenylglycineにもいえた(表2)(25)。その為、 α -methyl化の影響が、phenylglycine以外の化合物にも応用できるかを検討するため、サブグループIIに比較的特異的な作動薬であるL-CCG-I, サブグループIIIに特異的な作動薬であるL-AP4の α -methyl体(それぞれ、(2S, 3S, 4S)-2-methyl-2-(carboxycyclopropyl)glycine, MCCG-I; (S)-2-amino-2-methyl-4-phosphonobutanoic acid, MAP4)を合成し、活性を検討した(25)。

a



b

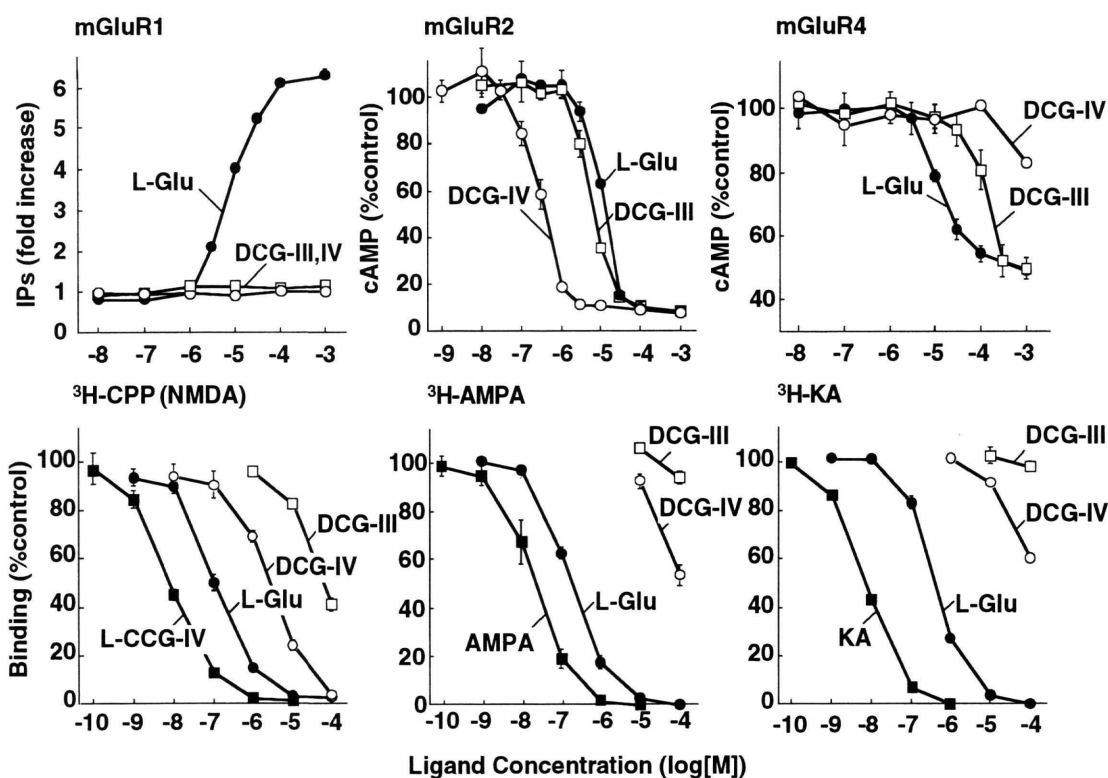
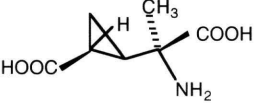
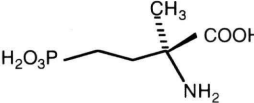
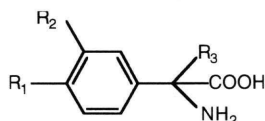


Fig. 2 Pharmacological activities of dicarboxycyclopropylglycine isomers. a: Structures of dicarboxycyclopropylglycine (DCG) isomers. Note that DCG-III can be considered as a hybrid molecule between L-CCG-II and L-CCG-III and DCG-IV as the one between L-CCG-I and L-CCG-IV. They thus contain both the extended and folded forms of glutamate in a single molecule. b: Activities of DCG isomers on metabotropic and ionotropic glutamate receptors. For mGluRs, agonist activities were determined as described in the legend of Fig.1. For ionotropic glutamate receptor, binding assays to brain membrane fraction were carried out using either [³H]-3-((*RS*)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP, for NMDA receptor), [³H]- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), and [³H]-kainic acid. DCG-IV is a specific mGluR2 agonist with some cross-reactivity with NMDA receptor.

Table 2 Pharmacological profiles of representative phenylglycine derivatives, MCCG and MAP4, on mGluRs.

	Chemical Structure ^a			mGluR1		mGluR2		mGluR4	
	R ₁	R ₂	R ₃	Agonist	Antagonist	Agonist	Antagonist	Agonist	Antagonist
(S)-4CPG	-COOH	-H	-H	- ^b	4 × 10 ⁻⁵ M	5 × 10 ⁻⁴ M	ND ^c	-	-
(+)-αM4CPG	-COOH	-H	-CH ₃	-	7 × 10 ⁻⁵ M	-	4 × 10 ⁻⁴ M	-	-
(S)-4C3HPG	-COOH	-OH	-H	-	3 × 10 ⁻⁵ M	2 × 10 ⁻⁵ M	ND	-	-
(R,S)-αM4C3HPG	-COOH	-OH	-CH ₃	-	4 × 10 ⁻⁴ M	-	6 × 10 ⁻⁴ M	-	-
(S)-3C4HPG	-OH	-COOH	-H	-	4 × 10 ⁻⁴ M	7 × 10 ⁻⁵ M	ND	-	-
(R,S)-αM4C3HPG	-OH	-COOH	-CH ₃	-	+ ^d	-	+	-	-
(2S,1'S,2'S)-MCCG				-	-	-	++ ^e	-	-
(S)-MAP4				-	-	+ ^f	ND ^c	++	ND

^a Basic phenylglycine structure is



^b No activity, ^c Not determined. ^d 25-50% inhibition of the effect of glutamate (used at EC₅₀ of each receptor subtype) at 1-mM concentration. ^e 50-90% inhibition. ^f 15-50% stimulatory activity compared with 1 mM glutamate. ^g 50-90% stimulatory activity. 4CPG, 4-carboxyphenylglycine; αM4CPG, α-methyl-4-carboxyphenylglycine; 4C3HPG, 4-carboxy-3-hydroxyphenylglycine; αM4C3HPG, α-methyl-4-carboxy-3-hydroxyphenylglycine; 3C4HPG, 3-carboxy-4-hydroxyphenylglycine; αM4C3HPG, α-methyl-3-carboxy-4-hydroxyphenylglycine; MCCG-I, (2S, 3S, 4S)-2-methyl-2-(carboxycyclopropyl)glycine; MAP4, (S)-2-amino-2-methyl-4-phosphonobutanoic acid.

その結果, 予想通り, MCCG-Iは mGluR2 に対する阻害薬を示した。ところが, MAP4は, 作動薬活性が残り, α-methyl 化の影響はリードとなる化合物に依存することが結論づけられた(25)。MAP4 に関しては新生ラット脊髄摘出標本を用いた電気生理実験では L-AP4 の作用に対する阻害薬作用があり, この相違の原因は不明である(26)。

3. 副嗅球情報伝達に於ける mGluR2 の役割

(1) 樹状突起間シナプス伝達における mGluR2 の役割

DCG-IV を見出した後, われわれはこの化合物を使って mGluR2 の中枢神経系での役割を解明することを試みた(18)。In situ hybridization や免疫組織化学的な検討から mGluR2 は小脳ゴルジ細胞, 海馬歯状回顆粒細胞, 大脳皮質などに存在するが, 特に副嗅球に多量に存在すること

が判った(27,28)。

副嗅球では, 僧帽細胞が鋤鼻神経からの求心性入力を脳内各所に中継しており, それと同時に副嗅球内の介在ニューロンである顆粒細胞とも樹状突起間シナプスを形成している。このシナプスは樹状突起間シナプスと呼ばれ, 顆粒細胞は僧帽細胞から放出されるグルタミン酸により興奮する一方, 僧帽細胞を GABA により抑制する双方向性のシナプスである(29)。免疫電子顕微鏡によると, mGluR2 は樹状突起間シナプスの顆粒細胞側に局在していた(18)。そこで DCG-IV により mGluR2 を活性化し, 顆粒細胞から僧帽細胞に向けての GABA 伝達に対する影響を, スライスパッチクランプ法(30)を用い検討した(18)。図 3a は, 顆粒細胞刺激により僧帽細胞にて記録されるシナプス電流であり, これは GABA_A 受容体の拮抗薬であるピキュキュリンで抑制されることから抑制性シナプス電流

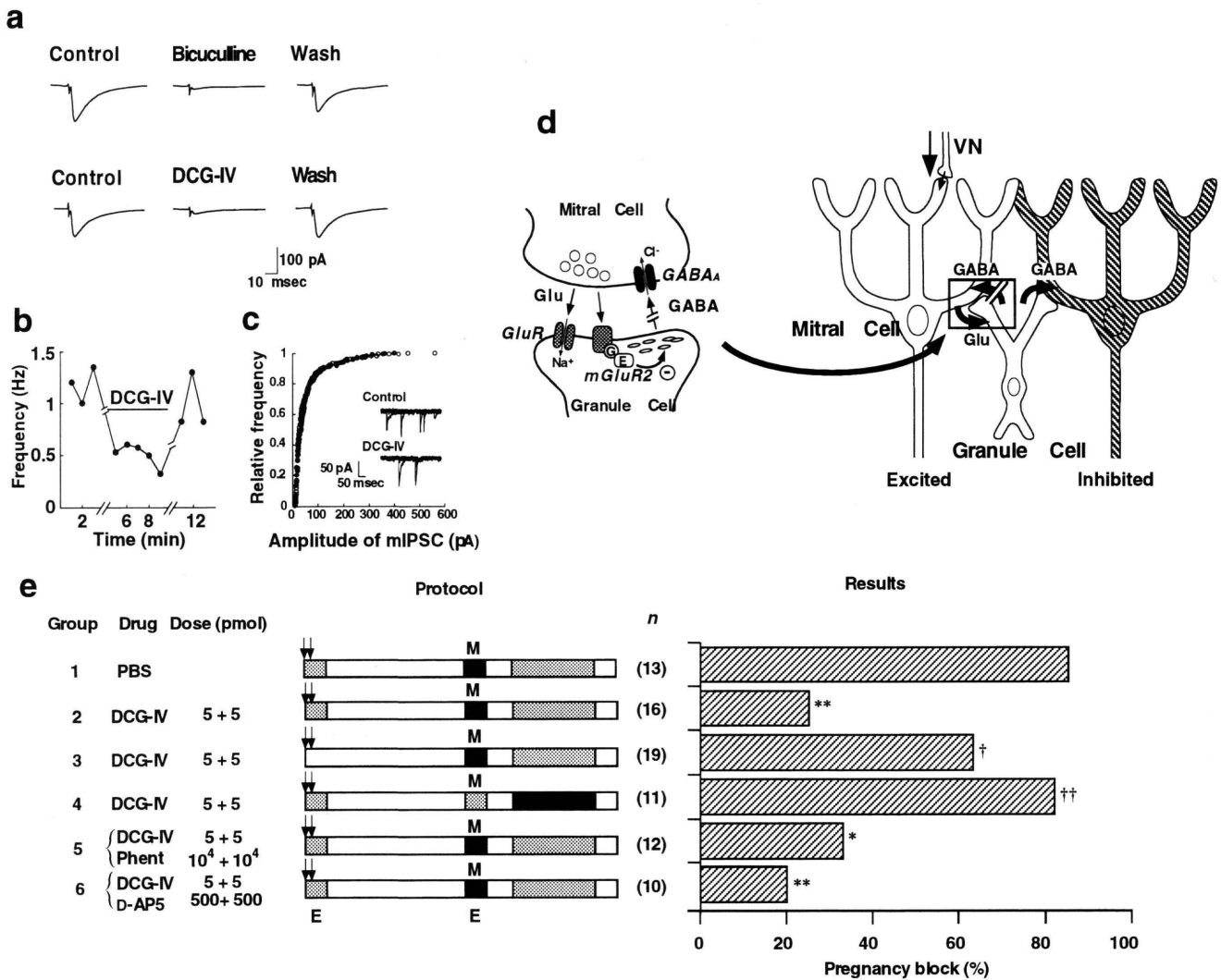


Fig. 3 Roles of mGluR2 in synaptic transmission in accessory olfactory bulb. a-c: Suppression of GABA-mediated IPSCs by DCG-V. a: Whole cell response of GABA-mediated IPSCs, recorded from mitral cell by stimulating a granule cell. The IPSC was reversibly suppressed by both bicuculline (10 μ M) and DCG-IV (3 μ M). b: The effect of DCG-IV on the frequency of miniature IPSCs, recorded in the presence of tetrodotoxin. Each point represents the mean frequency of mIPSCs in a 1-min period. DCG-IV reversibly reduces the frequency of mIPSC. c: Cumulative probability distributions of amplitudes of mIPSCs are plotted, before (●, 219 events) and after application of 3 μ M DCG-IV (○, 288 events). mIPSCs are shown in insets with 5 sweeps superimposed. There was no statistically significant difference in the two plots ($P > 0.1$) as assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. d: A model of a modulatory role of mGluR2 in dendrodendritic synaptic transmission between granule cell and mitral cells. The diagram on the right illustrates how the mGluR2-mediated suppression of GABA transmission relieves the inhibition to an initially excited mitral cell but maintains the lateral inhibition to a neighboring cell (hatched). See text for details. Glu, glutamate; GluR, ionotropic glutamate receptor; GABA_A, GABA_A receptor; G, G protein; E, intracellular effector; VN, vomeronasal nerve. e: Olfactory memory formation by mGluR activation in accessory olfactory bulb. Failure of the test exposure to male pheromones to block pregnancy was used to evaluate the formation of an olfactory recognition memory. M, mating; arrows, drug or phosphate-buffered saline (PBS) infusions; shaded blocks, exposure to pheromone from the BALB/C male; filled blocks, exposure to pheromone from the CBA male; Phent, phentolamine (adrenergic α -receptor antagonist); D-AP5, D-2-aminophosphonovalerate (NMDA-receptor antagonist) and E, estrus. The numbers in parentheses indicate numbers of animal tested. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, when compared with group 1. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, when compared with group 2. Data were analyzed with the Fisher exact probability test.

(IPSC) であることが判る。DCG-IV を作用させると抑制性シナプス電流は可逆的に抑制された。

次にこの作用がシナプス前部によるものか (例えば放出確率の低下), シナプス後部 (例えば GABA 受容体の阻害) によるものかを検討するために, miniature IPSC を測定した。miniature IPSC とはテトロドトキシンの存在下で記録されるシナプス前終末からのシナプス顆粒の自発的な放出である。1 個の miniature IPSC は決った量の伝達物質に対応すると考えられており, 従って, 振幅の減少は受容体の阻害によるものと考えられる。一方, 頻度の低下はシナプス前部からの放出確率の低下と考えられる。DCG-IV は, miniature IPSC の頻度を低下させた一方 (図 3b), 振幅は変化させなかった (図 3c)。この結果は, DCG-IV はシナプス前側である顆粒細胞側の mGluR2 に作用し, シナプス顆粒の放出の減少を引き起すものと考えられた。中枢神経系のその他の領域でも DCG-IV がシナプス前からの伝達物質の放出の抑制を引き起すことが報告され, サブグループ II の mGluR のシナプス前部への作用はより一般的な現象であることが判った (31~33)。これはある特定のサブタイプの mGluR の機能を明らかにしたはじめての例である。

さて, この機構は嗅覚情報伝達の中でどのような役割を果たしているのだろうか。副嗅球では, 僧帽細胞からグルタミン酸が放出される。それが顆粒細胞に作用するとイオンチャンネル型グルタミン酸受容体に作用して興奮性シナプス電位を引き起す一方, mGluR2 に作用し GABA の放出をシナプス前性に抑制する (図 3d)。この機構は僧帽細胞に対する GABA 抑制が解除されることを示唆する。一方で, 顆粒細胞は樹状突起を拡げて, 隣接しあう数多くの僧帽細胞とシナプスを形成している。顆粒細胞が僧帽細胞から興奮性入力を受けるとこのシナプス回路網を介し隣接する僧帽細胞に対し側方抑制をかけると考えられる。ところが興奮している僧帽細胞とのシナプスでは, mGluR2 が同時に機能するため GABA の放出が抑制され, その僧帽細胞は抑制から解除される。すなわち mGluR2 は自己抑制を解除する機構をつかさどり, 側方抑制機構とともに, 興奮した僧帽細胞と周辺の僧帽細胞との信号/雑音比を改善し, 異なった嗅覚入力の弁別に重要な役割を果たしていると考えられる。

(2) 妊娠阻止現象に於ける mGluR2 の役割

mGluR2 の嗅覚伝達に於ける役割をより明らかにするために, 次に行動学的手法を用い mGluR2 が嗅覚記憶形成にどのような役割を果たしているか検討した。雌マウスには交尾に際し相手の雄の匂いを記憶し, その後, 相手の雄と異なる未知の系統の雄の匂いを嗅ぐと妊娠が阻止されるという現象が知られている。この嗅覚による妊娠の阻止

は Bruce 効果として知られ, 交尾後の副嗅球内でのノルアドレナリン放出の増加が顆粒細胞からの GABA 放出を減少させ, 結果として交尾後曝露されたフェロモンに特異的な記憶が成立すると考えられている (34~37)。われわれは mGluR2 もノルアドレナリン受容体と同様に GABA 放出を抑制することから, 副嗅球への作動薬注入による mGluR2 の活性化が記憶を形成する可能性を検討した (38)。

この結果を図 3e に示す。実験には発情期 (E) にある BALB/C 系統の雌性マウスを用いた。カニユーレを用い副嗅球直上に薬物を投与すると同時に雄性 BALB/C のフェロモンに曝露した。次の発情期に CBA と交尾 (図中 M) させ, 24 時間から 26 時間後に CBA または BALB/C の雄のフェロモンに曝露 (TEST) した。その後, 妊娠が成立しているかを検討することで嗅覚に対する記憶が形成されているかを検討した。

1 群はネガティブコントロールとしてリン酸緩衝液を注入した群である。リン酸緩衝液では 1 回目に曝露したフェロモンに対する記憶が成立しなかったため, 2 回目に曝露したフェロモンは未知の雄の匂いと認識され, 妊娠が阻止された。2 群は 1 回目のフェロモンへの曝露と同時に DCG-IV を注入した例である。この群では妊娠阻止率が有意に低くなり, DCG-IV により記憶が成立したと考えられた。フェロモンへの曝露がないと DCG-IV を注入しても妊娠が阻止されることから (3 群) 記憶の成立のためには DCG-IV とホルモンへの曝露の両者が必要であることが判った。この記憶は DCG-IV の注入時に曝露されたフェロモンに特異的であり, 他のフェロモンでは妊娠阻止が起り (4 群), DCG-IV の作用が, 非特異的に副嗅球の神経回路を障害して妊娠阻止が成立しなくなっているわけではない。またアドレナリン α 受容体の阻害薬であるフェントールアミン, NMDA 受容体の阻害薬である D-AP5 では阻害されなかったことから両者の受容体を介するものではないと考えられた (5, 6 群)。これらの結果と DCG-IV が GABA の放出を抑制する事実と考え併せると, mGluR2 の活性化が僧帽細胞に対する抑制性入力を減少させ, 興奮性が高まった結果であると考えられる。この結果は, mGluR2 が嗅覚の記憶成立に重要な役割を果たしている事を示しているばかりではなく, 人工的に合成された化学物質が記憶の形成を促した初めての例と思われる。

4. おわりに

われわれは, 分子生物学的に同定された一方で薬理・生理学的な性質が判っていなかった受容体のクローンを発現することによって薬物を同定した。これは, これまで行われてきた受容体研究の方向とは全く逆のアプローチであり,

「reverse pharmacology」とも呼べるであろう。実際に、多くの研究者が同様なシステムを用い、mGluRのリガンドのスクリーニングを行い、実際に成果も上がってきている。今後もこのようなアプローチで多くの薬物が創薬されることを祈っている。

謝辞：この一連の研究は京都大学免疫研究施設第2部門（現生体情報科学講座）の中西 重忠教授の指導のもと行われたものです。また、一連のスクリーニングとそれに引続く実験にあたり化合物をご提供下さった以下の団体、方々に深くお礼申し上げます。武田薬品工業、大船 泰史先生、島本 啓子先生（以上サントリー生物有機化学研究所）、J. C. Watkins（Bristol 大学）。最後に関山 直広先生をはじめとして、お名前を全てあげることが出来ませんが共同研究者の方々にも深くお礼申し上げます。

文 献

- Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J and Weiss S: Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* **317**, 717-719 (1985)
- Sugiyama H, Ito I and Hirono C: A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* **325**, 531-533 (1987)
- Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R and Nakanishi S: Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **349**, 760-765 (1991)
- Nakanishi S: Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* **13**, 1031-1037 (1994)
- Aramori I and Nakanishi S: Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* **8**, 757-765 (1992)
- Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R and Nakanishi S: A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **8**, 169-179 (1992)
- Tanabe Y, Nomura A, Masu M, Shigemoto R, Mizuno N and Nakanishi S: Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J Neurosci* **13**, 1372-1378 (1993)
- Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N and Nakanishi S: Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem* **268**, 11868-11873 (1993)
- Kurokawa N and Ohfuné Y: The palladium(II)-assisted syntheses of (\pm)- α -(methylenecyclopropyl)glycine and (\pm)-*trans*- α -(carboxycyclopropyl)glycine, two bioactive amino acids. *Tetrahedron Lett* **26**, 83-84 (1985)
- Yamanoi K, Ohfuné Y, Watanabe K, Li PN and Takeuchi H: Syntheses of *trans*- and *cis*- α -(carboxycyclopropyl)glycines. Novel neuroinhibitory amino acids as L-glutamate analogue. *Tetrahedron Lett* **29**, 1181-1184 (1988)
- Shinozaki H, Ishida M, Shimamoto K and Ohfuné Y: Potent NMDA-like actions and potentiation of glutamate responses by conformational variants of a glutamate analogue in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol* **98**, 1213-1224 (1989)
- Shinozaki H, Ishida M, Shimamoto K and Ohfuné Y: A conformationally restricted analogue of L-glutamate, the (2*S*,3*R*,4*S*) isomer of L- α -(carboxycyclopropyl)glycine, activates the NMDA-type receptor more markedly than NMDA in the isolated rat spinal cord. *Brain Res* **480**, 355-359 (1989)
- Nakagawa Y, Saitoh K, Ishihara T, Ishida M and Shinozaki H: (2*S*,3*S*,4*S*)- α -(carboxycyclopropyl)glycine is a novel agonist of metabotropic glutamate receptors. *Eur J Pharmacol* **184**, 205-206 (1990)
- Ishida M, Akagi H, Shimamoto K, Ohfuné Y and Shinozaki H: A potent metabotropic glutamate receptor agonist: electrophysiological actions of a conformationally restricted glutamate analogue in the rat spinal cord and *Xenopus* oocytes. *Brain Res* **537**, 311-314 (1990)
- Hayashi Y, Tanabe Y, Aramori I, Masu M, Shimamoto K, Ohfuné Y and Nakanishi S: Agonist analysis of 2-(carboxycyclopropyl)glycine isomers for cloned metabotropic glutamate receptor subtypes expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* **107**, 539-543 (1992)
- Kawai M, Horikawa Y, Ishihara T, Shimamoto K and Ohfuné Y: 2-(Carboxycyclopropyl)glycines: binding, neurotoxicity and induction of intracellular free Ca²⁺ increase. *Eur J Pharmacol* **211**, 195-202 (1992)
- Ishida M, Saitoh T, Shimamoto K, Ohfuné Y and Shinozaki H: A novel metabotropic glutamate receptor agonist: marked depression of monosynaptic excitation in the newborn rat isolated spinal cord. *Br J Pharmacol* **109**, 1169-1177 (1993)
- Hayashi Y, Momiyama A, Takahashi T, Ohishi H, Ogawa-Meguro R, Shigemoto R, Mizuno N and Nakanishi S: Role of a metabotropic glutamate receptor in synaptic modulation in the accessory olfactory bulb. *Nature* **366**, 687-690 (1993)
- Wilsch VW, Pidoplichko VI, Opitz T, Shinozaki H and Reymann KG: Metabotropic glutamate receptor agonist DCG-IV as NMDA receptor agonist in immature rat hippocampal neurons. *Eur J Pharmacol* **262**, 287-291 (1994)
- Uyama Y, Ishida M and Shinozaki H: DCG-IV, a potent metabotropic glutamate receptor agonist, as an NMDA receptor agonist in the rat cortical slice. *Brain Res* **752**, 327-330 (1997)
- Watkins JC, Evans RH, Mewett KN, Olverman HJ and Pook PC: Recent advances in the pharmacology of excitatory amino acids. In *Neurology and Neurobiology*. Vol **24**, Excitatory Amino Acid Transmission, Edited by Hicks TP, Lodge D and McLennan H, pp19-26, Liss, New York (1987)
- Birse EF, Eaton SA, Jane DE, Jones PL, Porter

- RH, Pook PC, Sunter DC, Udvarhelyi PM, Wharton B, Roberts PJ, et al: Phenylglycine derivatives as new pharmacological tools for investigating the role of metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Neuroscience* **52**, 481-488 (1993)
- 23) Ito I, Kohda A, Tanabe S, Hirose E, Hayashi M, Mitsunaga S and Sugiyama H: 3,5-Dihydroxyphenyl-glycine: a potent agonist of metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport* **3**, 1013-1016 (1992)
- 24) Hayashi Y, Sekiyama N, Nakanishi S, Jane DE, Sunter DC, Birse EF, Udvarhelyi PM and Watkins JC: Analysis of agonist and antagonist activities of phenylglycine derivatives for different cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. *J Neurosci* **14**, 3370-3377 (1994)
- 25) Sekiyama N, Hayashi Y, Nakanishi S, Jane DE, Tse HW, Birse EF and Watkins JC: Structure-activity relationships of new agonists and antagonists of different metabotropic glutamate receptor subtypes. *Br J Pharmacol* **117**, 1493-1503 (1996)
- 26) Jane DE, Thomas NK, Tse HW and Watkins JC: Potent antagonists at the L-AP4- and (1S, 3S)-ACPD-sensitive presynaptic metabotropic glutamate receptors in the neonatal rat spinal cord. *Neuropharmacology* **35**, 1029-1035 (1996)
- 27) Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S and Mizuno N: Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* **53**, 1009-1018 (1993)
- 28) Ohishi H, Ogawa MR, Shigemoto R, Kaneko T, Nakanishi S and Mizuno N: Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, in rat cerebellar cortex. *Neuron* **13**, 55-66 (1994)
- 29) Kaba H and Nakanishi S: Synaptic mechanisms of olfactory recognition memory. *Rev Neurosci* **6**, 125-141 (1995)
- 30) Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B and Takahashi T: A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers Arch* **414**, 600-612 (1989)
- 31) Kobayashi K, Manabe T and Takahashi T: Presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Science* **273**, 648-650 (1996)
- 32) Kamiya H, Shinozaki H and Yamamoto C: Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *J Physiol (Lond)* **493**, 447-455 (1996)
- 33) Poncer JC, Shinozaki H and Miles R: Dual modulation of synaptic inhibition by distinct metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* **485**, 121-134 (1995)
- 34) Brennan P, Kaba H and Keverne EB: Olfactory recognition: a simple memory system. *Science* **250**, 1223-1226 (1990)
- 35) Rosser AE and Keverne EB: The importance of central noradrenergic neurones in the formation of an olfactory memory in the prevention of pregnancy block. *Neuroscience* **15**, 1141-1147 (1985)
- 36) Kaba H and Keverne EB: The effect of microinfusions of drugs into the accessory olfactory bulb on the olfactory block to pregnancy. *Neuroscience* **25**, 1007-1011 (1988)
- 37) Kaba H and Keverne EB: Analysis of synaptic events in the mouse accessory olfactory bulb with current source-density techniques. *Neuroscience* **49**, 247-254 (1992)
- 38) Kaba H, Hayashi Y, Higuchi T and Nakanishi S: Induction of an olfactory memory by the activation of a metabotropic glutamate receptor. *Science* **265**, 262-264 (1994)

Abstract – Metabotropic glutamate receptor: its ligands and function in the olfactory system. Yasunori HAYASHI (Cold Spring Harbor Laboratory, Jones Building, 1 Bungtown Road, Cold Spring Harbor, NY 11724, USA). *Folia Pharmacol. Jpn.* (Nippon Yakurigaku Zasshi) **113**, 73-83 (1999)

The metabotropic glutamate receptors (mGluRs) consist of at least eight different subtypes. However, the lack of specific ligands for this class of receptors limited the characterization of their roles. In this study, a series of glutamate derivatives was systematically tested for agonist and antagonist activities for the mGluR subtypes, individually expressed in cell lines. Among various compounds tested, (2*S*, 1'*R*, 2'*R*, 3'*R*)-2-(2,3-dicarboxycyclopropyl)glycine (DCG-IV) was found to be an effective agonist for mGluR2 and α -methyl-4-carboxyphenylglycine (α M4CPG) was found to be an antagonist for both mGluR1 and mGluR2. Using DCG-IV, I showed that mGluR2 mediates presynaptic inhibition of GABA release from granule cells at the dendrodendritic synapse of the accessory olfactory bulb (AOB). This mechanism was considered to relieve a mitral cell from GABAergic inhibition and, furthermore, to be involved in lateral inhibition of surrounding mitral cells and thus enhancing the signal/noise ratio of olfactory sensation. I also show that an activation of mGluR2 in AOB by infusion of DCG-IV induces olfactory memory, which can mimic the pregnancy block phenomenon of female mice. This is the first report of a role of specific subtype of mGluR in the central nervous system.

Keywords: metabotropic glutamate receptor; glutamate analog; ligand; structure-activity relationship; olfaction

著者プロフィール

林 康紀 (はやし やすのり)

コールド・スプリング・ハーバー研究所 (米国, ニューヨーク州) ポストドクトラルフェロー。1994年3月京都大学医学部医学研究科修了。医学博士。同年4月から1996年3月まで東京大学医学部附属脳研究施設脳生理部門にて日本学術振興会特別研究員, 4月からコールド・スプリング・ハーバー研究所 Roberto Malinowのもとに留学し現在に至る。記憶現象の分子生物学的な基盤を解析することを目標としている。

hayashi@cshl.org / yhayashi-ky@umin.ac.jp

