

平成13年度厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）

総括及び分担研究報告書

骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究

（課題番号 H13-痴呆・骨折-014）

平成14年4月

主任研究者 米田幸雄

（金沢大学大学院 自然科学研究科）

厚生科学研究費補助金(21世紀型医療開拓推進研究事業)

総括研究報告書

骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究

主任研究者 米田 幸雄 金沢大学大学院 自然科学研究科教授

研究要旨：脳内神経情報伝達物質であるグルタミン酸(Glu)に対するレセプターが末梢組織である破骨細胞あるいは骨芽細胞においても発現している可能性が近年報告されている。本研究ではイオノトロピック型 Glu レセプターである N-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターによる骨芽細胞機能調節機構を検討した。NMDA レセプターアンタゴニストである MK-801 の長期暴露により骨芽細胞分化の指標であるアルカリフォスファターゼ活性、転写制御因子 core binding factor α -1 (Cbfa1) の DNA 結合能およびたんぱく質発現は有意に抑制された。さらに骨芽細胞分化の指標であるカルシウム蓄積およびオステオカルシン発現も抑制された。

分担研究者

中村洋一

金沢大学 助教授

ヴラディミール・ジェイ・バルツァー

金沢大学 助教授

萩田喜代一

摂南大学助教授

倉本展行

金沢大学助手

協力研究者

檜井栄一

金沢大学大学院後期課程学生

A. 研究目的

骨粗鬆症は、単位体積あたりの骨組織量が全身性および進行性に減少する疾患であり、骨成分が保持されたまま骨量が低下して、骨格の脆弱性を来す代謝性骨疾患である。主な臨床的発現である骨折に伴う不動は、骨量低下をさらに加速するとともに、寝たきりや痴呆に傾斜する可能性が高く早急なる対策が望まれるのが現状である。原発性骨粗鬆症としては、骨代謝回転亢進を特徴とする I 型（閉経後）と、骨代謝回転の低下する II 型（老年性）が臨床例が最も多い。前者は 51 歳から 75 歳で発症する例が多いのに対して、後者は 70 歳以上で年齢に比例して

発症する。いずれの場合も、原因としては骨吸収と骨形成のバランス破綻と考えられているが、現在の治療方針は予防的、対症的あるいは抑制的な域を出ない。一方、NMDA レセプターは脳内神経情報伝達物質である、グルタミン酸 (Glu) に対するレセプターサブタイプの一つであるが、骨質の吸収を担う破骨細胞だけでなく、骨質を分泌する骨芽細胞にも、N-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターが存在する可能性が報告されている。すなわち、破骨細胞と骨芽細胞の成長あるいは増殖に NMDA レセプターが決定的な役割を演じるという。したがって本研究では、NMDA レセプターの機能修飾を通じて、骨細胞増殖あるいは再生を指向する治療戦略を展開することを目的とした。

B. 研究方法

ラット新生仔頭蓋骨前頭部から 0.25% トリプシンおよび 0.1% コラゲナーゼを用いた連続酵素処理法により初代培養骨芽細胞を単離し、 α -MEM 中で培養を開始した。翌日、アスコルビン酸 (50 μ g/mL) および β -グリセロリン酸 (5 mM) を含む α -MEM に培養液を交換してこの時点を経験 0 日目とし、MK-801 (10–100 μ M) 存在下あるいは非存在下で最大 28 日間培養した。各日数経過後に細胞を回収してアルカリフォスファターゼ活性、カルシウム蓄積量および細胞数を測定した。培養 7 日および 21 日目の細胞から mRNA を抽出し、各 NMDA レセプターサブユニットを特異的に認識するプライマーを用いて RT-PCR を行った。また培養 7 日目の細胞

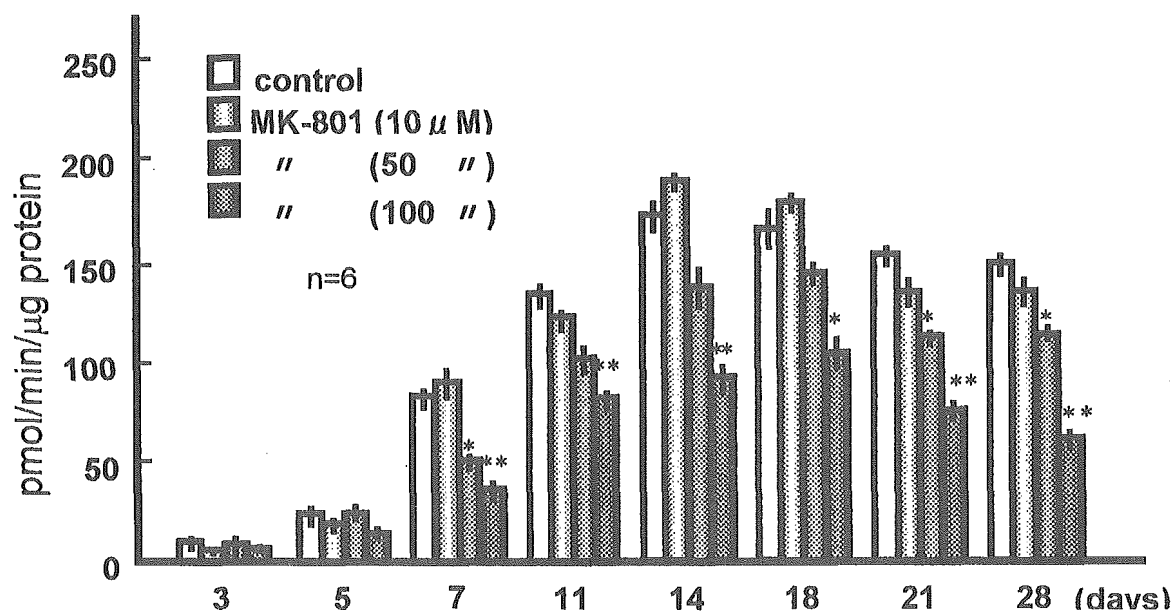


Fig. 1. Effect of MK-801 long-term application on alkaline phosphatase activities. Cells were cultured in α -MEM in either the presence or absence of MK-801 at 10, 50 or 100 μ M, followed by determination of alkaline phosphatase activities. Values are the mean \pm S.E. from six different experiments. * P <0.05, ** P <0.01, significantly different from the value obtained in the absence of MK-801 at each stage.

を用い、NR1 および NR2D を特異的に認識する抗体による免疫組織化学法を行った。さらに各日数経過後の細胞から核抽出液を調製しゲルシフトアッセイ法により core binding factor α -1 (Cbfa1) DNA 結合能を測定し、さらに抗 Cbfa1 抗体を用いたイムノブロッティング法によりたんぱく質発現を検討した。

細胞培養に用いた動物の取り扱いは金沢大学動物実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

RT-PCR 法および免疫組織化学法により、NMDA レセプターを構成する NR1 および NR2D の mRNA およびたんぱく質両方の発現を確認した。NMDA レセプターアンタゴニスト MK-801 を長期暴露すると、濃度依存的に骨芽細胞分化の指標であるアルカリフォスファターゼ活性 (Fig. 1) は培養 7 日目以降に、また成熟化の指標で

あるカルシウム蓄積量は培養 18 日目以降にそれぞれ有意に低下した。さらに、骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである核内転写制御因子 Cbfa1 の DNA 結合能 (Fig. 2) およびたんぱく質発現は共に、MK-801 の長期間添加により培養 7 日目以降において有意に抑制された。28 日目のカルシウム蓄積量を指標に MK-801 の作用時期を検討したところ、骨芽細胞成長抑制作用は培養 3 日目から 11 日までの時期に限定されることが明らかとなった。MK-801 以外の NMDA レセプターアンタゴニスト D-AP5 および DCQX の骨芽細胞に対する影響について 28 日目のカルシウム蓄積量を指標に検討したところ、MK-801 と同様に濃度依存的に骨芽細胞成長抑制作用が観察された。一方、細胞数に関してはいずれの培養日数にでも MK-801 により著変は認められなかった。

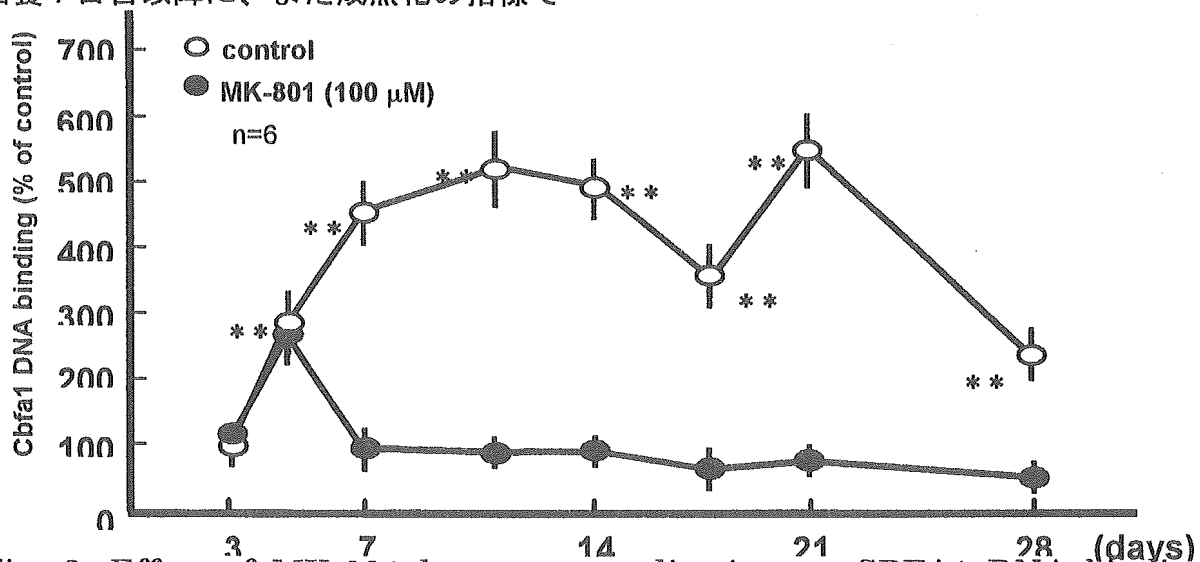


Fig. 2. Effect of MK-801 long-term application on CBFA1 DNA binding activities. Cells were cultured in α -MEM in either the presence or absence of MK-801 at 100 μ M, followed by preparation of nuclear extracts at each stage, and subsequent determination of CBFA1 DNA binding activities by gel sift assay. Values are the mean \pm S.E. from six different experiments. **P < 0.01, significantly different from the value obtained in the absence of MK-801 at each stage.

D. 考察

以上の結果から、頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞に発現する NMDA レセプターは、細胞増殖あるいは成熟よりはむしろ細胞分化を選択的に調節する可能性が示唆される。これまで骨芽細胞において NMDA レセプターが発現しているという報告はされてきたが、本研究により今回初めてその機能的意義が明らかとなった。このほかにも我々は初代培養骨芽細胞においてセカンドメッセンジャー応答性の代謝調節型 GluR の発現を既に報告している。現在まで中枢神経系における GluR を標的とした中枢神経疾患薬の開発が進められてきたが、GluR に非常に特異性の高い化合物にもかかわらず血液脳関門を通過しないという理由で採用されない化合物も多い。しかしながら逆にこのような化合物が選択的に骨芽細胞に発現する GluR に作用し、骨代謝性疾患薬として機能する可能性もある。したがって今後は卵巣摘出による骨粗鬆症モデル動物を用いたこのような化合物探求をしていくとともに、骨芽細胞における他の GluR 発現およびその機能解析を行うだけでなく、破骨細胞、軟骨細胞あるいは骨細胞における Glu の役割についても検討していく必要がある。さらには骨芽細胞に作用する Glu の由来つまりは Glu 作動性神経支配を受けるのかまたは細胞間でオートクラインあるいはパラクライン的に作用しているのかを解析していくことも急務であると思われる。

E. 結論

1. 初代培養骨芽細胞において NMDA レ

セプターを構成する NR1 および NR2D の mRNA およびたんぱく質発現がともに観察された。

2. NMDA レセプターアンタゴニストである MK-801 の長期暴露により骨芽細胞分化の指標であるアルカリフォスファターゼ活性、成熟化の指標であるカルシウム蓄積およびオステオカルシンの発現が抑制された。

3. 骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである転写制御因子 Cbfa1 の DNA 結合能およびたんぱく質発現がともに MK-801 により抑制された。

4. 培養 11 日目以降に MK-801 を添加しても骨芽細胞成長抑制作用は認められなかった。さらに、いずれの培養日数においても MK-801 は細胞数には著変を与えなかった。

5. 以上の結果から、頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞に発現する NMDA レセプターは、細胞増殖あるいは成熟よりはむしろ細胞分化を選択的に調節する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Eiichi Hinoi, Kiyokazu Ogita, Yutaka Takeuchi, Hiroshi Ohashi, Takaharu Maruyama and Yukio Yoneda. Characterization with [³H]quisqualate of group I metabotropic glutamate receptor subtype in rat central and peripheral excitable tissues. *Neurochem. Int.*, 38, 277-285 (2001).
2. Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Group III metabotropic glutamate receptors in rat cultured calvarial osteoblasts. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.*, **281**, 341-346 (2001).
3. Eiichi Hinoi and Yukio Yoneda. Expression of GluR6/7 subunits of kainate receptors in rat adenohypophysis. *Neurochem. Int.*, **38**, 539-547 (2001).
 4. Yukio Yoneda, Nobuyuki Kuramoto, Tomoya Kitayama and Eiichi Hinoi. Consolidation of transient ionotropic glutamate signals through nuclear transcription factors in the brains. *Prog. Neurobiol.*, **63**, 697-719 (2001).
 5. Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura, Vladimir J. Balcar, Keita Kubo, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda. Constitutive expression of heterologous N-methyl-D-aspartate receptor subunits in rat adrenal medulla. *J. Neurosci. Res.*, in press (2002).
2. 学会発表
1. Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Selective potentiation of AP1 DNA binding in rat adrenal by a stressful manipulation. The 5th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry (Brisbane, Australia), 2001, Jan. 28-31.
 2. 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 : 腺性下垂体における Kainate レセプターの発現. 第 74 回日本薬理学会年会 (横浜), 2001 年 3 月 22 日.
 3. 藤森さゆ美, 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 : ストレス負荷に伴う副腎内 AP1DNA 結合能上昇と NMDA レセプターの関与. 日本薬学会第 121 回年会 (札幌), 2001 年 3 月 28 日.
 4. 竹森章浩, 檜井栄一, 倉林広明, 中村洋一, 米田幸雄 : 初代培養骨芽細胞死に対するピルビン酸の防御作用. 第 99 回日本薬理学会近畿部会 (広島), 2001 年 6 月 22 日.
 5. 檜井栄一, 藤森さゆ美, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養骨芽細胞に発現する NMDA レセプター. 第 99 回日本薬理学会近畿部会 (広島), 2001 年 6 月 22 日.
 6. Masanori Yoneyama, Eiichi Hinoi, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Distribution of group I metabotropic glutamate receptors in rat central and peripheral structures. 18th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry (Buenos Aires, Argentina), 2001, Aug. 26-31.
 7. Sayumi Fujimori, Eiichi Hinoi, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Potentiation by stress of AP1 DNA binding in rat pituitary and adrenal glands. 18th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry (Buenos Aires, Argentina), 2001, Aug. 26-31.
 8. Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Functional expression of NMDA receptors in cultured rat calvarial osteoblasts. 18th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry (Buenos Aires, Argentina), 2001, Aug. 26-31.
 9. 檜井栄一, 藤森さゆ美, 中村洋一, 米田幸雄 : 骨芽細胞の分化メカニズムにおける NMDA レセプターの機能探索. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (Neuro 2001) (京都), 2001 年 9 月 26 日.
 10. 藤森さゆ美, 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養骨芽細胞における GABA レセプターの発現. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (Neuro 2001) (京都), 2001 年 9 月 26 日.
 11. 藤森さゆ美, 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 : ストレス負荷に伴う中枢および末梢部位における AP1 DNA 結合能

- の上昇. 第 31 回日本神経精神薬理学会年会 (広島), 2001 年 10 月 5 日.
12. 檜井栄一, 藤森さゆ美, 中村洋一, 米田幸雄 : 初代培養骨芽細胞におけるイオノトロピック型グルタメイトレセプターの発現. 第 74 回日本生化学会大会 (京都), 2001 年 10 月 25 日.
 13. 檜井栄一, 藤森さゆ美, 竹森章浩, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養骨芽細胞における転写制御因子 CBFA1 発現に対する NMDA レセプターの関与. 第 100 回日本薬理学会近畿部会 (大阪), 2001 年 11 月 17 日.
 14. 藤森さゆ美, 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養骨芽細胞における GABA 受容体の機能的発現. 第 100 回日本薬理学会近畿部会 (大阪), 2001 年 11 月 17 日.
 15. 角田隆巳, 檜井栄一, 藤森さゆ美, 杉本明夫, 米田幸雄 : テアニンの脳保護作用の作用機序に関する研究. 日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台), 2002 年 3 月 24-27 日.
 16. 檜井栄一, 藤森さゆ美, 中村洋一, 米田幸雄 : 初代培養骨芽細胞におけるグループⅢメタボトロピック型グルタメイトレセプターの機能的発現. 第 75 回日本薬理学会年会 (熊本), 2002 年 3 月 14 日.
 17. 藤森さゆ美, 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養骨芽細胞における機能的 GABA_B 受容体の発現. 日本薬学会第 122 回年会 (千葉), 2002 年 3 月 26 日.
 18. 竹森章浩, 檜井栄一, 藤森さゆ美, 倉林広明, 中村洋一, 米田幸雄 : ピルビン酸の初代培養骨芽細胞死に対する防御作用. 日本薬学会第 122 回年会 (千葉), 2002 年 3 月 27 日.
 19. Yukio Yoneda, Eiichi Hinoi and Sayumi Fujimori. NMDA receptors expressed in cultured rat calvarial osteoblasts. The 14th International Congress of Pharmacology (San Francisco, U.S.A.), 2002, Jul.
 20. Akihiro Takemori, Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori and Yukio Yoneda. NMDA receptors expressed in cultured rat calvarial osteoblasts. The 14th International Congress of Pharmacology (San Francisco, U.S.A.), 2002, Jul.

厚生科学研究費補助金(21世紀型医療開拓推進研究事業)
分担研究報告書

研究課題「骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究」
(主任研究者：米田幸雄)

分担研究課題「ポリアミンの輸送と細胞機能制御に関する研究」
分担研究者：中村洋一（金沢大学大学院自然科学研究科・助教授）

研究要旨：動物細胞の増殖・分化に深く関与しているとされている塩基性低分子ポリアミン（スペルミン，スペルミジン）が，最近グルタミン酸受容体の活性制御に重要な働きをしていることが明らかとなった。本研究ではアストロサイトとミクログリアを中心材料として，その細胞内外の濃度調節を担う輸送系を検索し，またポリアミン分子による細胞機能調節の仕組みを検討した。アストロサイトは $[^3\text{H}]$ スペルミジンを高活性に取り込み，その活性は細胞膜電位で駆動する高親和性の輸送体によるものであることが示唆された。一方ミクログリアにおいては低濃度のポリアミンに暴露することによりアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

A. 研究目的

動物細胞内に多量に存在する内在性の低分子有機カチオン，ポリアミンは，細胞内においてDNA，RNAなどの核酸に結合して，それぞれの立体構造の安定化と変動を誘発する。またポリアミンはDNAポリメラーゼに結合することにより複製反応を促進し，アミノアシルtRNAに結合して翻訳を活性促進させる。このように古くからポリアミンの主な生理作用は，DNAの安定化や複製促進，蛋白合成の活性化に伴う細胞の増殖や分化の促進とされてきた。しかし近年，特定の内因性ポリアミンがグルタミン酸（Glu）受容体のサブタイプであるNMDA受容体の Ca^{2+}

チャネルの開口を顕著に促進したり，AMPA受容体のチャネルを細胞内部から抑制したりするなど，細胞膜上に存在する受容体やイオンチャネルに対して相互作用を有する事が報告され，ポリアミンの細胞間シグナリング調節作用も大いに注目されることとなった。

本研究では骨の形成・吸収を制御する重要な内在性因子の一つとして，ポリアミンが機能している可能性に注目し，その検討のためのインビトロ実験系の確立にむけて，各種培養細胞におけるポリアミン輸送系の検討を行い，またポリアミンの細胞に及ぼす新たな機能調節作用を検索した。

B. 研究方法

1. アストロサイトの培養 ラット胎仔大脳皮質をトリプシン処理により単離し2週間程度の培養の後24-又は96-wellに蒔き代えてポリアミン取り込み反応に供した。

2. ミクログリアの培養 ラット新生仔全脳細胞を2-4週間培養し、形成された単層細胞の上に現れる球形の小型細胞を振盪および遠心により集め96-wellプレートに二次培養した。二次培養に浮遊細胞用のプレートを用いることにより、ほぼ純粋なミクログリア細胞が得られた。

3. ポリアミン取り込み活性 [^3H]スペルミジン添加し一定時間後に非放射性のスペルミジンを含む塩溶液で洗浄し、残る放射活性を取り込み量とした。

4. 一酸化窒素(NO)産生 リポポリサッカライド(LPS)刺激によるNO産生は試薬添加24時間後の培養上清中の NO_2 をDAN試薬法により定量し評価した。

5. その他 細胞のミトコンドリア活性は

WST8を用いて測定した。DNA断片化はBrdU標識を用いてELISA定量した。

6. 倫理面への配慮 細胞培養に用いた動物の取り扱い金は沢大学動物実験指針に基づいた。

C. 研究結果

1. ポリアミン輸送体の存在

最初に試みた3種類の培養細胞(海馬ニューロン、硬膜由来フィブロblast、大脳皮質アストロサイト)のうち、アストロサイトのスペルミジン輸送活性が特に高かったため、動物細胞におけるポリアミン輸送系検討の手始めに、アストロサイトを用いることとした。

培養アストロサイトの取り込み量は、反応時間60分で2 nmol/mg protein以上に達した。また ^3H スペルミジン輸送における基質依存性を検討した結果、両逆数プロットは直線にのり、 K_m 値および V_{max} 値はそれぞれ $1.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$ および $65 \pm 17 \text{ pmol/mg protein/min}$ を示した。

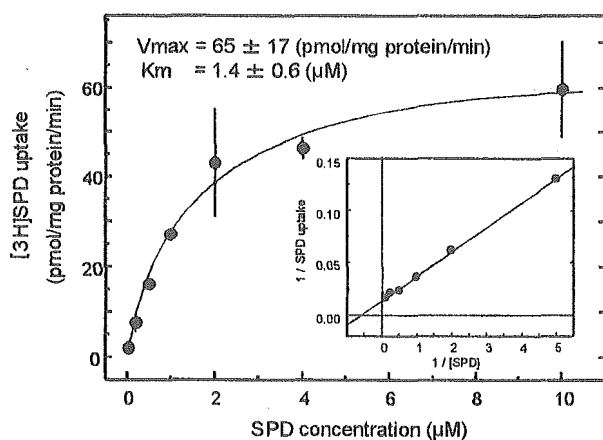


Fig. 1. Concentration dependence of [^3H]SPD uptake in cortical astrocytes.

Astrocytes were incubated for 20 min with different concentrations of unlabeled SPD (containing no more than 1 $\square\text{Ci/ml}$ radiolabeled SPD) at 37°C .

Inset: Lineweaver-Burk plot of the results. SPD uptake follows a saturable kinetics with a K_m of $1.4 \pm 0.6 \square\text{Ci}$ and a V_{max} of $65 \pm 17 \text{ pmol/mg protein/min}$. Each value indicates the mean \pm SD of three independent experiments performed triplicate.

各種ポリアミンおよびポリアミン類似体に対する ^3H スペルミジン輸送活性の基質特異性を検討したところ、特にスペルミンにおいて輸送活性の濃度依存的な阻害効果が観察され、スペルミンのポリアミン輸送体に対する親和性はスペルミジンとほぼ同程度であり、プトレッシンやアグマチンに比べて約30倍高かった。

さらに培養アストロサイトにおける ^3H スペルミジン輸送メカニズムを解析するため、反応液中のNaClをKClまたはCholine Cl (Cho Cl)に置換し測定したところ、Cho Clでは変化がみられなかったのに対し、KClで輸送活性の有意な減少が観察された。また K^+ イオノホア (valinomycin, gramicidin)の添加によっても著明に阻害された。これらのことから、ポリアミン輸送は K^+ 濃度勾配で形成させる膜電位に従った輸送である可能性が強く示唆される。

2. ポリアミン輸送機能の調節

次にこのポリアミン輸送系に対する細胞内調節メカニズムの検討をおこなった。細胞内cAMP濃度を上昇させる膜透過性アナログで知られるdibutyryl cAMP (dbcAMP)に24時間暴露後、 ^3H スペルミジン輸送活性の顕著な減少が観察された。この減少は、ホスホジエステラーゼ阻害剤である3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX)の暴露によっても同様に観察された。またアドレナリン・受容体アゴニストのイソプロテレノールとアデニル酸シクラーゼ活性剤であるフォルスコリンによるスペルミジン輸送活性に与える影響を検討したところ、それぞれ単独では有意な変化はなかったが、dbcAMPやIBMXとの組み合わせによりdbcAMPやIBMXの効果をさらに増強させることが判明した。よって細胞内cAMP濃度がポリアミン輸送活性の調節に関与している可能性が示唆される。

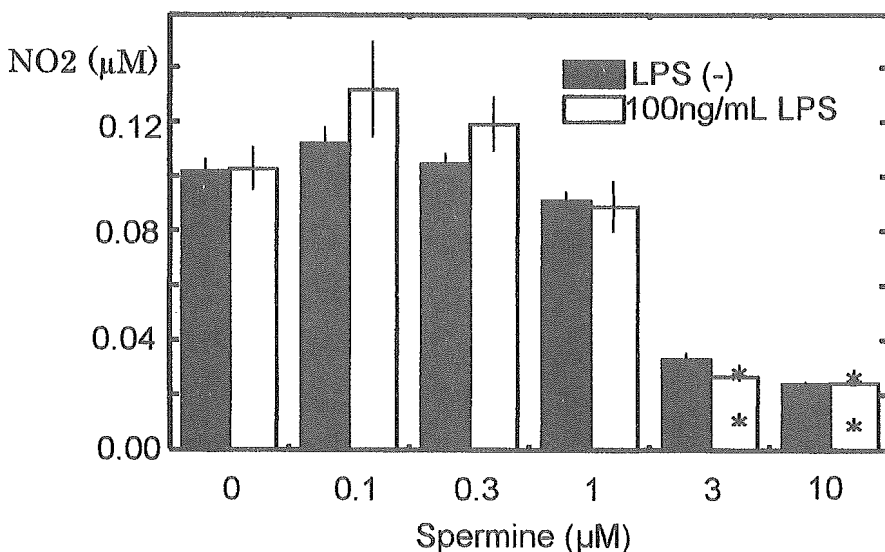


Fig.2. Effect of spermine on the mitochondrial activity of cultured microglia with and without stimulation with 100 ng/ml LPS. After incubation with various concentrations of spermine and with and without LPS for 24 hr, mitochondrial activity was measured by WST8 color development

3. ポリアミンのアポトーシス誘導作用

培養ミクログリアをリポポリサッカライド(LPS)で刺激した時のNO産生活性は、 $1\sim 10^{-6}$ Mのスペルミン、あるいはスペルミジン添加により濃度依存的に減少し、 10^{-6} Mでほぼ完全に抑制された。プトレッシンは有意な変化を及ぼさなかった。

また、同濃度域のスペルミジンあるいはスペルミン添加24時間後の細胞ミトコンドリア活性は、LPS刺激の有無にかかわらず、顕著に抑制された。一方、アストロサイトの細胞活性はポリアミンにより変化を受けず、むしろ増強させる傾向があった。

ミクログリアでは細胞のアポトーシスが起きている可能性を考え、ELISA法によりその定量化を試みた。細胞に前もってBrdUを取り込ませ、ポリアミン暴露後に断片化DNAを定量した。DNA断片化がスペルミンの濃度依存性に起こることが観察された。その濃度域は $1\sim 10^{-6}$ Mで、上述のNO産生阻害の場合と同じであった。またスペルミジンでもほぼ同様な作用が観察された。

D. 考察

骨形成・吸収を司る骨芽細胞および破骨細胞あるいは軟骨細胞にポリアミンがいかなる作用を示すのかを明らかにすることが本研究の最終目標であるが、今年度はその細胞膜輸送系について、アストロサイトを用いて検討を加えた。培養アストロサイトにはポリアミンを細胞内に取り込む高親和性で高活性な輸送担体が存在し、その輸送は Na^+ 非依存性であり、 K^+ の濃度勾配によって形成される膜電位

に従った輸送であると考えられた。またポリアミン輸送体は細胞内のcAMP濃度によって機能調節を受ける可能性が示唆された。

これらの結果はポリアミンが細胞分化や増殖に関与するだけでなく、グルタミン酸シグナリングの制御にも重要な役割を担っているという最近の知見を鑑みて、非常に興味深い。中枢においてグルタミン酸シグナリングが重要な働きをしていることが確立され、現在は末梢においてグルタミン酸シグナリングがどのように機能しているかが焦点である。骨形成・吸収機能においてもグルタミン酸シグナリングが重要な働きをしている可能性が高いことが本研究班の研究で明らかになりつつあるが、ポリアミンがグルタミン酸シグナリング機構の有力な調節因子であることは、骨形成・吸収機能においてもポリアミンの作用を明らかにする必然に迫られる。本分担研究もさらに発展させる必要があることを痛感する。ポリアミン輸送系を効果的に制御することができれば、グルタミン酸受容体を介して、骨形成・吸収の細胞間シグナリングの調節も可能かもしれない。

一方、ミクログリアにおいてポリアミンがアポトーシスを誘導することが見いだされた。この作用はこれまで考えられてきた増殖分化促進作用とは正反対の作用であり、その作用濃度域が $1\mu\text{M}$ 程度であることには驚嘆する。広範な細胞種を用いて、従来の先入観にとらわれない再検討を要する。骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞等の骨形成・吸収機能に密接な細

胞種を精査する必要がある

E. 結論

1. アストロサイトは ^3H スペルミジンを高活性に取り込み、その活性は細胞膜電位で駆動する高親和性の輸送体によるものであることが示唆された。
2. ミクログリアにおいては低濃度のポリアミンに暴露することによりアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。
3. 以上のことより、骨形成・吸収機能を果たす各種細胞種においても、ポリアミン輸送系や細胞機能に対するポリアミン作用を明らかにすることにより、末梢におけるグルタミン酸シグナリングのポリアミン調節機構についてさらなる研究が展開されることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoichi Nakamura, Q. - S. Si and K. Kataoka. Differential regulation of microglial NO production by protein kinase C inhibitors. *Neurochem. Int.*, **38**, 1-7 (2001).
2. Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Group III metabotropic glutamate receptors in rat cultured calvarial osteoblasts. *Biochem Biophys Res Comm.*, **281**, 341-346 (2001).

2. 学会発表

1. 平居貴夫, 倉本展行, 中村洋一, 米田幸雄 : NMDA 暴露による AP1 DNA 結合上昇機構の解析. 日本薬学会第 121 年会 (札幌), 2001 年 3 月 29 日.

2. 中道範隆, 大野博司, 倉本展行, 高柳雅子, 中村洋一, 米田幸雄 : NMDA 受容体を介する細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度変化の観察. 日本薬学会第 121 年会 (札幌), 2001 年 3 月 29 日.
3. 馬場勝弘, 中村洋一, 米田幸雄 : XRE 結合蛋白質の脳内分布. 日本薬学会第 121 年会 (札幌), 2001 年 3 月 29 日.
4. 高本晃子, 馬場勝弘, 中村洋一, 米田幸雄 : 神経活性アミノ酸のラット脳シナプトソーム分画における取り込み. 日本薬学会第 121 年会 (札幌), 2001 年 3 月 29 日.
5. 村上浩司, 中村洋一, 米田幸雄 : ATP による培養アストロサイト NO 産生の増強. 日本薬学会第 121 年会 (札幌), 2001 年 3 月 29 日.
6. 藤森さゆ美, 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 : ストレス負荷に伴う副腎内 AP1 DNA 結合能の上昇と NMDA レセプターの関与. 日本薬学会第 121 年会 (札幌), 2001 年 3 月 28 日.
7. 米山雅紀, 北山友也, 中村洋一, 米田幸雄 : 歯状回顆粒細胞層における新規 DNA 合成に対する NMDA 応答性 AP1 結合能上昇の影響. 日本薬学会第 121 年会 (札幌), 2001 年 3 月 28 日.
8. 荒町勝英, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養アストロサイトにおける ^3H スペルミジンの取り込み活性. 第 74 回日本薬理学会年会 (横浜), 2001 年 3 月 23 日.
9. 中村洋一, 大巻深穂, 村上浩司, 米田幸雄 : 培養ミクログリアからのグルタミン酸放出と NO 産生の ATP による阻害. 第 74 回日本薬理学会年会

- (横浜), 2001年3月23日.
10. 中道範隆, 大野博司, 倉本展行, 高柳雅子, 中村洋一, 米田幸雄 : NMDA 受容体活性化による細胞内 Ca^{2+} 濃度増加に対する二価鉄イオンの阻害作用. 第 74 回日本薬理学会年会 (横浜), 2001年3月22日.
 11. 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 : 腺性下垂体におけるカイニン酸レセプターの発現. 第 74 回日本薬理学会年会 (横浜), 2001年3月22日.
 12. Tomoya Kitayama, Masanori Yoneyama, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Modulation by NMDA of new DNA synthesis in hippocampus of adult mouse brain. The 5th Meeting of the Asia Pacific Society for Neurochemistry (Brisbane, Australia), 2001, Jan. 28-31.
 13. Yukio Yoneda, Noritaka Nakamichi and Yoichi Nakamura. Modulation by ferrous ions of intracellular free Ca^{2+} ions through NMDA receptor channel in cultured rat cortical neurons. The 5th Meeting of the Asia Pacific Society for Neurochemistry (Brisbane, Australia), 2001, Jan. 28-31.
 14. Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Selective potentiation of AP1 DNA binding in rat adrenal by a stressful manipulation. The 5th Meeting of the Asia Pacific Society for Neurochemistry (Brisbane, Australia), 2001, Jan. 28-31.
 15. 中道範隆, 大野博司, 中村洋一, 米田幸雄 : NMDA 受容体活性化に伴う神経細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇に対する遊離 Fe^{2+} の阻害効果. 第 99 回日本薬理学会近畿部会 (広島), 2001年6月22日.
 16. 竹森章浩, 檜井栄一, 倉林広明, 中村洋一, 米田幸雄 : 初代培養骨芽細胞死に対するピルビン酸の防御作用. 第 99 回日本薬理学会近畿部会 (広島), 2001年6月22日.
 17. 檜井栄一, 藤森さゆ美, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養骨芽細胞に発現する NMDA レセプター. 第 99 回日本薬理学会近畿部会 (広島), 2001年6月22日.
 18. Masanori Yoneyama, Eiichi Hinoi, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Distribution of Group I metabotropic glutamate receptors in rat central and peripheral structures. Joint Meeting of the 18th Biennial Meeting of the ISN and the 32nd Annual Meeting of the ASN (Buenos Aires, Argentina), 2001, Aug. 26-31.
 19. Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Functional expression of NMDA receptors in cultured rat calvarial osteoblasts. Joint Meeting of the 18th Biennial Meeting of the ISN and the 32nd Annual Meeting of the ASN (Buenos Aires, Argentina), 2001, Aug. 26-31.
 20. Sayumi Fujimori, Eiichi Hinoi, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Potentiation by stress of AP1 DNA binding in rat pituitary and adrenal glands. Joint Meeting of the 18th Biennial Meeting of the ISN and the 32nd Annual Meeting of the ASN (Buenos Aires, Argentina), 2001, Aug. 26-31.
 21. Takao Hirai, Hiroko Maruyama, Nobuyuki Kuramoto, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Potentiation by NMDA of AP1 DNA binding in cultured hippocampal neurons. Joint Meeting of the 18th Biennial Meeting of the ISN and the 32nd Annual Meeting of the ASN

- (Buenos Aires, Argentina), 2001, Aug. 26-31.
22. Katsuhiko Baba, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Nuclear proteins with affinity for xenobiotic responsive element in rat brain. Joint Meeting of the 18th Biennial Meeting of the ISN and the 32nd Annual Meeting of the ASN (Buenos Aires, Argentina), 2001, Aug. 26-31.
 23. Tomoya Kitayama, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Suppression by NMDA of selective accumulation of 5-Bromo-2'-deoxyuridine into dentate granular layers of adult murine hippocampus. Joint Meeting of the 18th Biennial Meeting of the ISN and the 32nd Annual Meeting of the ASN (Buenos Aires, Argentina), 2001, Aug. 26-31.
 24. Yoichi Nakamura, Koji Murakami, Miho Ohmaki and Yukio Yoneda. ATP potentiates LPS-induced nitric oxide production in astrocytes, but inhibits in microglia. Joint Meeting of the 18th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the 32nd Annual Meeting of the ASN (Buenos Aires, Argentina), 2001, Aug. 26-31.
 25. 藤森さゆ美, 檜井栄一, 倉林広明, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養骨芽細胞における GABA レセプターの発現. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都), 2001 年 9 月 26 日.
 26. 檜井栄一, 藤森さゆ美, 中村洋一, 米田幸雄 : 骨芽細胞の分化メカニズムにおける NMDA レセプターの機能探索. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都), 2001 年 9 月 26 日.
 27. 米山雅紀, 北山友也, 中村洋一, 米田幸雄 : グルタミン酸レセプターサブユニットの免疫組織化学的検出. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都), 2001 年 9 月 26 日.
 28. 馬場勝弘, 中村洋一, 米田幸雄 : 小脳における XRE 結合蛋白質. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都), 2001 年 9 月 26 日.
 29. 中道範隆, 大野博司, 中村洋一, 米田幸雄 : 遊離二価鉄イオンの NMDA 受容体チャネル開口阻害効果. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都), 2001 年 9 月 26 日.
 30. 平居貴生, 中村洋一, 米田幸雄 : 初代培養海馬神経細胞への磁力線短期暴露に伴う転写制御因子 AP1 DNA 結合の上昇. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都), 2001 年 9 月 27 日.
 31. 荒町勝英, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養アストロサイトにおけるスペルミン輸送活性. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都), 2001 年 9 月 28 日.
 32. 村上浩司, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養アストロサイトと培養ミクログリアにおける ATP による NO 産生の制御. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都), 2001 年 9 月 28 日.
 33. 北山友也, 米山雅紀, 中村洋一, 米田幸雄 : NMDA 応答性を示す BrdU 陽性細胞の同定. 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会 (京都), 2001 年 9 月 28 日.

34. 北山友也, 米山雅紀, 中村洋一, 米田幸雄 : 成熟マウス海馬および網膜における新規 DNA 合成に対する NMDA シグナルの影響. 第 31 回日本神経精神薬理学会年会 (広島), 2001 年 10 月 14 日.
35. 藤森さゆ美, 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 : ストレス負荷に伴う中枢および末梢部位における AP1 DNA 結合能の上昇. 第 31 回日本神経精神薬理学会年会 (広島), 2001 年 10 月 15 日.
36. Noritaka Nakamichi, Hiroshi Ohno, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Modulation by ferrous ions of intracellular free calcium ions in cultured rat cortical neurons exposed to NMDA. 2001 Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum Regional Meeting (Hiroshima, Japan), 2001, Oct. 5.
37. 檜井栄一, 藤森さゆ美, 中村洋一, 米田幸雄 : 初代培養骨芽細胞におけるイオトロピック型グルタメイトレセプターの発現. 第 74 回日本生化学会大会 (京都), 2001 年 10 月 25 日.
38. 平居貴生, 中村洋一, 米田幸雄 : 磁力線短期曝露の初代培養海馬神経細胞への影響. 第 100 回日本薬理学会近畿部会 (大阪), 2001 年 11 月 17 日.
39. 藤森さゆ美, 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養骨芽細胞における GABA 受容体の機能的発現. 第 100 回日本薬理学会近畿部会 (大阪), 2001 年 11 月 17 日.
40. 檜井栄一, 藤森さゆ美, 竹森章浩, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養骨芽細胞における転写制御因子 CBFA1 発現に対する NMDA レセプターの関与. 第 100 回日本薬理学会近畿部会 (大阪), 2001 年 11 月 17 日.
41. 馬場勝弘, 中村洋一, 米田幸雄 : 脳内における XRE 結合蛋白質の解析. 第 100 回日本薬理学会近畿部会 (大阪), 2001 年 11 月 17 日.
42. 米山雅紀, 北山友也, 中村洋一, 米田幸雄 : NMDA レセプターサブユニットの免疫組織化学的検出時における固定液の影響. 第 100 回日本薬理学会近畿部会 (大阪), 2001 年 11 月 17 日.
43. 北山友也, 中村洋一, 米田幸雄 : 神経幹細胞培養に関する基礎的研究. 第 100 回日本薬理学会近畿部会 (大阪), 2001 年 11 月 17 日.
44. 中道範隆, 大野博司, 中村洋一, 米田幸雄 : NMDA 受容体を介する細胞内遊離 Ca^{2+} 維持機構のインビトロ加齢に伴う変化. 第 75 回日本薬理学会年会 (熊本), 2002 年 3 月 14 日.
45. 北山友也, 米山雅紀, 中村洋一, 米田幸雄 : 成熟マウス中枢神経系増殖細胞に対する NMDA 投与の影響. 第 75 回日本薬理学会年会 (熊本), 2002 年 3 月 14 日.
46. 檜井栄一, 藤森さゆ美, 中村洋一, 米田幸雄 : 初代培養骨芽細胞におけるグループ III メタボトロピック型グルタメイトレセプターの機能的発現. 第 75 回日本薬理学会年会 (熊本), 2002 年 3 月 14 日.
47. 馬場勝弘, 米田幸雄, 中村洋一 : ラット小脳における XRE 結合蛋白質の解析. 第 75 回日本薬理学会年会 (熊本), 2002 年 3 月 15 日.
48. 荒町勝英, 中村洋一, 米田幸雄 : 培養アストロサイトにおけるポリアミンの輸送活性. 日本薬学会第 122 年会 (千葉), 2002 年 3 月 26 日.
49. 村上浩司, 大巻深穂, 中村洋一, 米田

- 幸雄：ミクログリアからのNOおよびグルタミン酸放出のATPによる抑制. 日本薬学会第122年会(千葉), 2002年3月26日.
50. 米山雅紀, 北山友也, 中村洋一, 米田幸雄：マウス脳海馬内イオトロピック型グルタメイトレセプターサブユニットの免疫組織化学的検出. 日本薬学会第122年会(千葉), 2002年3月26日.
51. 杉山千絵, 高本晃子, Vladimir J. バルツァー, 中村洋一, 米田幸雄：ラット大脳皮質培養神経細胞における各種グルタメイトレセプター活性化に伴うAPI DNA結合の変動. 日本薬学会第122年会(千葉), 2002年3月26日.
52. 藤森さゆ美, 檜井栄一, 中村洋一, 米田幸雄：培養骨芽細胞における機能的GABA B受容体の発現. 日本薬学会第122年会(千葉), 2002年3月26日.
53. 中道範隆, 大野博司, 中村洋一, 米田幸雄：遊離 Fe^{2+} のNMDA受容体チャンネル開口調節作用. 日本薬学会第122年会(千葉), 2002年3月26日.
54. 竹森章浩, 檜井栄一, 藤森さゆ美, 倉林広明, 中村洋一, 米田幸雄：ピルビン酸の初代培養骨芽細胞死に対する防御作用. 日本薬学会第122年(千葉), 2002年3月27日.
55. 高野桂, 中村洋一, 米田幸雄：ポリアミンによる培養ミクログリアの細胞機能抑制. 日本薬学会第122年会(千葉), 2002年3月27日.

厚生科学研究費補助金(21世紀型医療開拓推進研究事業)
分担研究報告書

研究課題「骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究」
(主任研究者：米田幸雄)

分担研究課題「グルタミン酸トランスポーターの多様性に関する研究」
分担研究者：ヴラディミール・ジェイ・バルツァー(金沢大学薬学部・助教授)

研究要旨：中枢神経系の重要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸のトランスポーター機能研究には、L-アスパラギン酸(L-Asp)およびD-アスパラギン酸(D-Asp)が基質として古くから使用されている。それは、L-AspとD-Aspが種々のグルタミン酸トランスポーターに対して、ほぼ同程度の親和性を示すからである。本研究では、脳内各部位におけるグルタミン酸トランスポーター多様性を追究するために、L-AspとD-Aspに対する親和性相違の可能性について、オートラジオグラフィ法を用いて検討したところ、 $[^3\text{H}]$ L-Aspと $[^3\text{H}]$ D-Aspのどちらも脳全体に結合が見られたが、ともに他の脳内部位に比べ小脳灰白質に2倍から3倍の強い結合が観察された。しかしながら、小脳の両結合を比較すると、 $[^3\text{H}]$ L-Asp結合の方が $[^3\text{H}]$ D-Asp結合よりも、3倍以上高いことが明らかとなった。いずれの脳内部位でも、 $[^3\text{H}]$ L-Aspと $[^3\text{H}]$ D-Asp両結合に対して、L-Aspはほぼ同等度の阻害活性を示したのに対して、D-Aspは大脳皮質、海馬および線条体においては、L-Aspと同程度の両結合阻害能を示したが、小脳においてはL-AspよりもD-Aspの方が、両結合に対する阻害活性が3倍以上弱いことが判明した。以上の結果から、小脳においてはD-AspよりL-Aspの方が、グルタミン酸トランスポーターに対して親和性が高いことが明らかとなった。したがって、小脳にはL-AspとD-Aspを識別する未知のグルタミン酸トランスポーターが存在する可能性が示唆される。

A. 研究目的

グルタミン酸は、中枢神経系の重要な興奮性伝達物質であるが、その機能的な重要性の反面、過剰なグルタミン酸は神経毒として神経細胞破壊作用を有する。グルタミン酸トランスポーターは、グルタミン酸の細胞外濃度を低値に保つことで、シナプス伝達の停止に関与するとともに、グルタミン酸の興奮毒性から神経細胞を保護する上で重要な役割を果たす。

一方、最近の研究ではグルタミン酸が中枢神経系だけでなく、末梢神経系やあるいは非神経組織においても、情報伝達物質としての機能を有する可能性が示されている。事実、我々は骨芽細胞に機能的なイオノトロピック型およびメタボトロピック型グルタミン酸レセプターが発現することを見出した。したがって、骨組織においてもグルタミン酸トランスポーターが発現する可能性は充分に考えられる。

グルタミン酸トランスポーターの機能研究

には、L-アスパラギン酸 (L-asp) および D-アスパラギン酸 (D-asp) が基質として古くから使用されているが、それは両者が種々のグルタミン酸トランスポーターに対して、ほぼ同程度の親和性を示すからである。本研究では、骨組織におけるグルタミン酸トランスポーターの機能解析研究の前段階として、脳内各部位におけるグルタミン酸トランスポーターの多様性を追究するために、L-asp と D-asp に対する親和性相違の可能性について、オートラジオグラフィ法を用いて検討した。

B. 研究方法

12 週齢の Wistar 系雄性ラットから摘出した全脳を直ちに凍結し、小脳、大脳皮質、海馬および線条体を含む水平凍結切片 (厚さ 20 μm) を作成した。切片を室温で 45 分間十分に洗浄後、4 $^{\circ}\text{C}$ で 20 nM [^3H]L-asp または [^3H]D-asp を含むリン酸緩衝液中で反応させた。反応終了後、切片をリン酸緩衝液で 4 回および蒸留水で 1 回、それぞれ洗浄したのち乾燥させた。得られた切片を [^3H]L-asp では 3 週間、 [^3H]D-asp では 6 週間、それぞれトリチウム感受性フィルムにトリチウム標準線源とともに感光させた。これらのオートラジオグラムを用いて、両放射性基質の脳内特定部位での結合能を測定した。また、両放射性基質の脳内グルタミン酸トランスポーターへの結合に対する両異性体の阻害作用を解析し、50% 阻害濃度 IC_{50} 値を算出した。

C. 研究結果

両放射性基質を切片と反応させた結果、どちらの場合も脳全体に結合が見られたが、海馬や大脳皮質などの前脳部位に比べ、小脳灰白質で 2 倍から 3 倍の強い結合が観察された。さらに、両放射性基質の結合を比較すると、前脳部位では [^3H]L-asp の特異的結合は、 [^3H]D-asp よりも 1.2 倍から 2.3 倍強力であった。一方、小脳灰白質では、 [^3H]L-asp の結合は [^3H]D-asp よりも 2.2 倍から 3.3 倍強力であり、より顕著な結合能の違いが観察さ

れた。次に、両異性体に対する親和力の違いを検討するために阻害実験を行った (Fig. 1)。 [^3H]L-asp 結合に対して、L-asp も D-asp も大脳皮質、海馬、線条体および中核の前脳部位では、ほぼ同等度の阻害活性を示した。これに対して、小脳では L-asp は IC_{50} 値 441 nM と他の脳内部位と同程度の阻害活性を示したが、D-asp は 1386 nM と L-asp と比較して 3 倍以上弱い阻害活性を示すことが判明した。同様に、 [^3H]D-asp に対しても前脳部位では両異性体はほぼ同等度の阻害活性を示したが、小脳では D-asp は L-asp よりも 3 倍以上弱い阻害活性を示した。これが、各部位におけるグルタミン酸トランスポーターサブタイプの発現の相違に起因するのかわを RT-PCR 法により検討した。小脳、大脳皮質および網膜での既知 5 種類のグルタミン酸トランスポーターの発現を比較した結果、EAAT1 から EAAT 4 までは、いずれの中脳部位にも同様な発現が見られたが、EAAT5 は網膜にのみ発現が見られた。したがって、既知のいずれのグルタミン酸トランスポーターについても、大脳皮質と小脳の間で発現の相違は観察されなかった。

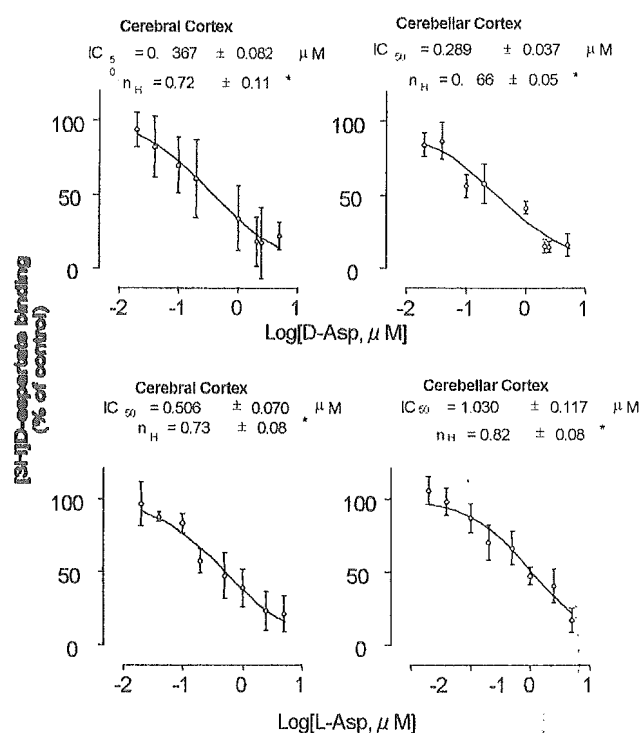


Fig. 1. Inhibition of [^3H]D-asp binding by non-radioactive L-asp and D-asp in cerebral and cerebellar cortex

D. 考察

脳切片上のグルタミン酸トランスポーターへの³H]-L-asp 結合は、ほぼ完全にNa⁺依存性であるとともに、何れのグルタミン酸レセプターリガンドに対しても感受性を示さないことから、オートラジオグラフィ法とデンストメトリー法の組合せを基盤とする本研究成果の信頼度は高いと推察される。脳内各部位の中でも、特に小脳においてのみD-aspの同トランスポーターへの親和力が、L-aspよりも有意に低い事実は、小脳における異なるトランスポーター蛋白質発現か、あるいは異なる翻訳後修飾の可能性を示唆する。しかしながら、RT-PCR 解析の結果では既知のトランスポーターmRNA 発現は、大脳皮質と小脳皮質の間に著明な相違が見られなかったため、今後は蛋白質レベルでの解析を通じて、翻訳後修飾の可能性を探究する必要があると思われる。

E. 結論

以上の結果から、小脳に発現するグルタミン酸トランスポーターはL-aspとD-aspを識別する性質を有する可能性が示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Vladimir J. Balcar. Thirty years of L-glutamate transport in the CNS. *Psychiatrie* (Prague), 5, (Suppl. 2) 2-4 (2001).
2. L. Pliss, V. Bubeniková, Vladimir J. Balcar and F. Šťastný. Characterisation of hippocampal neurodegeneration after intracerebroventricular administration of N-acetyl-aspartyl-glutamate. *Psychiatrie* (Prague), 5, (Suppl. 2) 102-104 (2001).
3. Šťastný, L. Pliss, I. Škultétyová, D. Ježová, V. Bubeniková and Vladimir J. Balcar. NAAG changes properties of blood brain barrier. *Psychiatrie* (Prague), 5, (Suppl. 2) 134-136 (2001).
4. Vladimir J. Balcar, Akiko Takamoto and Yukio Yoneda. Neurochemistry of L-glutamate transport in the CNS : Thirty

years of progress. *Collect. Czech. Chem. Comm.*, 66, 1315-1340 (2001).

5. L. Pliss, I. Škultétyová, D. Ježová, Vladimir J. Balcar and F. Šťastný. N-acetyl-L-aspartyl-glutamate changes functional and structural properties of rat blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.*, 317, 85-88 (2001).
 6. Akiko Takamoto, L. B. Quiggin, I. Lieb, E. Shave, Vladimir J. Balcar and Yukio Yoneda. Differences between D- and L-aspartate binding to the Na⁺-dependent binding sites on glutamate transporters in frozen sections of rat brain. *Life Sci.*, 70, 991-1001 (2002).
 7. Takao Hirai, Nobuyuki Kuramoto, Hiroko Maruyama, Vladimir J. Balcar, Yoichi Nakamura and Yukio Yoneda. Potentiation of nuclear activator protein-1 DNA binding following brief exposure to N-methyl-D-aspartate in immature cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Res.*, 67, 523-532. (2002).
 8. C. E. – H. Moussa, A. D. Mitrovic, R. J. Vandenberg, T. Provis, C. Rae, W. A. Bub and Vladimir J. Balcar. Effects of L-CCG III on metabolism and L-glutamate transport in the mammalian central nervous system. *Neurochem. Res.*, in press (2002).
 9. Eiichi Hinoi, Sayumi Fujimori, Yoichi Nakamura, Vladimir J. Balcar, Keita Kubo, Kiyokazu Ogita and Yukio Yoneda. Constitutive expression of heterologous N-methyl-D-aspartate receptor subunits in rat adrenal medulla. *Neurosci. Res.*, in press (2002).
- ### 2. 学会発表
1. Neurochemistry of L-glutamate transport in the CNS : Thirty years of progress. Prague Centre of Psychiatry and 3rd Medical Faculty, Charles University (Prague, Czech Republic), 2001, Jun. 5.
 2. Thirty years of L-glutamate transport in the CNS. Plenary Lecture. 10th National Conference of the Society for Biological Psychiatry (Luhacovice, Czech Republic), 2001, Jun. 6.
 3. 高本晃子, Vladimir J. バルツアー, 杉山千絵, 宝田剛志, 米田幸雄 : ラット脳

- 内グルタミン酸トランスポーターに対するD-アスパラギン酸とL-アスパラギン酸結合の相違. 第99回日本薬理学会近畿部会(広島), 2001年6月22日.
4. Pharmacology of L-glutamate transport in the CNS. Hokuriku University (Kanazawa, Japan), 2001, Jul. 26.
 5. 高本晃子, Vladimir J. バルツアー, 米田幸雄: 脳内グルタミン酸トランスポーターのオートラジオグラフィ法による検出. 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会(京都), 2001年9月26日.
 6. Glutamate transporters studied by autoradiography in the rat central nervous system. COMBIO Satellite meeting "The Neurobiochemistry of Glutamate", Australian National University (Canberra, ACT, Australia), 2001, Sep. 30.
 7. Thirty years of L-glutamate transport in brain; From neurochemistry to molecular biology and back. COMBIO 2001 Meeting, Symposium "Animal metabolism", Australian National University (Canberra, ACT, Australia), 2001, Oct. 2.
 8. 杉山千絵, 高本晃子, Vladimir J. バルツアー, 米田幸雄: ラット大脳皮質培養神経細胞における各種グルタメイトレセプター活性化に伴う AP1 DNA 結合の変動. 第31回日本神経精神薬理学会年会(広島), 2001年10月4日.
 9. 高本晃子, Vladimir J. バルツアー, 杉山千絵, 宝田剛志, 米田幸雄: グルタミン酸トランスポーターに対する D-アスパラギン酸と L-アスパラギン酸の親和力の相違. 第31回日本神経精神薬理学会年会(広島), 2001年10月5日.