

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）

依存性薬物による脳内薬物受容体の機能変化に関する
分子生物学的研究

平成10年度研究報告書

Molecular Biological Changes in Brain Receptors Induced by Drugs of Abuse

Annual Report

Supported by Grant from the Ministry of Health and Welfare, Japan in 1998

(Chief; Mitsumoto Sato)

平成11年4月

主任研究者 佐藤光源

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）

依存性薬物による脳内薬物受容体の機能変化に関する
分子生物学的研究

平成 1 0 年度研究報告書

Molecular Biological Changes in Brain Receptors Induced by Drugs of Abuse

Annual Report

Supported by Grant from the Ministry of Health and Welfare, Japan in 1998

(Chief; Mitsumoto Sato)

平成 1 1 年 4 月

主任研究者 佐藤光源

平成10年度 研究報告

目 次

1. 平成10年度総括研究報告	1
主任研究者 佐藤光源 (東北大学医学部精神医学教室)	
2. 平成10年度分担研究報告	
逆耐性獲得機構におけるG蛋白質介在脳内薬物受容体伝達系の変化に関する研究	5
—メタンフェタミン投与動物におけるG蛋白質エフェクターの発現の変化について—	
分担研究者 菊池周一 (国立精神・神経センター精神保健研究所薬物依存研究部)	
メタンフェタミン投与に伴う脳内DNAメチラーゼmRNAの変化	16
主任研究者 佐藤光源 (東北大学医学部精神医学教室)	
研究協力者 沈 昊偉、戸田 重誠、吉田 寿美子、沼知陽太郎 (東北大学医学部精神医学教室)	
mrt1の解説：行動感作形成への関与について	23
分担研究者 梶井 靖 (国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部)	
研究協力者 平岡秀一、藤山 航、西川 徹 (国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部)	
3. 分担研究者氏名一覧	29
4. 平成10年度研究報告会プログラム	31
5. 平成10年度研究成果刊行物一覧	33

1. 平成10年度 総括研究報告

主任研究者 佐藤光源

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

依存性薬物による脳内薬物受容体の機能変化に関する分子生物学的研究
（平成10年度）

総括研究報告

主任研究者 佐藤光源 東北大学医学部精神医学教室教授
分担研究者 梶井 靖 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部研究員
菊池周一 国立精神・神経センター精神保健研究所薬物依存研究部研究員

〔研究の背景〕

薬物依存は世界的な社会問題となっており、精神依存（渴望）対策だけが研究課題とされてきたが、最近では、薬物の長期乱用で起きる二次性脳障害（精神病や後遺症の発生）がクローズアップされてきた。この二次性脳障害の存在は、長年にわたる日本での覚せい剤精神病の臨床研究が明らかにしたものであった。特に、精神病への発展経過を逆耐性現象（逆耐性）で説明できること、さらにそれを動物に再現できるという我々の研究報告は、その後の国際的な研究活動の起点となった。現在、(1) 覚せい剤で容易に精神依存が起きるのはなぜか、(2) 乱用が長期化すると精神分裂病（分裂病）類似の精神病が起きるのはなぜか、(3) 覚せい剤精神病が再発しやすさを残すのはなぜか、という3点の解明が急がれている。覚せい剤精神病で分裂病類似の症状が再発する脳の脆弱性が解明されれば、分裂病の最大の問題である再発しやすさと難治化のメカニズムの解明に応用できる。

〔研究目的〕

上記の(1)はかなり解明できたが、(2)と(3)の原因となる脳の神経可塑性変化が不明である。逆耐性は長期持続性の機能変化なので、覚せい剤の長期乱用中に起きる蛋白合成の変化が注目されている。逆耐性に特異的に関わる分子遺伝学的な仕組みを下記の(1)～(3)の研究によって解明するのが、本研究の目的である。

- (1) 逆耐性獲得機構における脳内薬物受容体伝達系の変化—メタンフェタミン急性・慢性効果におけるG蛋白質の分子生物学的変化を中心に—（菊池周一）
- (2) メタンフェタミン急性、慢性投与による脳内コルチコステロン受容体 mRNA の変化—逆耐性形成への感受性が異なる近交系ラットを用いた検討—（佐藤光源）
- (3) メタンフェタミンに応答する新規遺伝子の単離とその行動感作形成への関与についての検討（梶井 靖）

〔研究方法、結果、考察〕

- (1) 逆耐性獲得機構における脳内薬物受容体伝達系の変化—メタンフェタミン急性・慢性効果におけるG蛋白質の分子生物学的変化を中心に—（菊池周一）

G蛋白質自体のシグナル伝達を百日咳毒素で阻止すると逆耐性が起きない、逆耐性の形成後に線条体 $Gi2\alpha$ サブユニット mRNA の発現が変化する、等の報告があるが、 $G\beta$ 、 γ サブユニットの変化は未知である。MAPの急性・慢性投与で、腹側被蓋野(VTA)と側坐

核における β 、 γ サブユニットの発現量を *in situ hybridization* 法で測定した。MAPの急性投与では両部位で β 1サブクラスの mRNA 発現が増加し、VTAが報酬系となるドーパミン起始細胞部位なので、依存の発生に関連する変化と考えられた。亜慢性投与では、側坐核だけで増加してVTAでは不変であった。ドーパミン神経終末部位、とくに前シナプス性のG蛋白 β 1サブクラスを介した神経伝達の変化が長期持続性の脳の機能変化に関わるものと考え、G蛋白 β 1サブユニット、エフェクター蛋白の変化を免疫組織染色で調べた。逆耐性形成後のMAP再投与で、G蛋白 β 1 subunitが中脳腹側被蓋野で増加せず、 β -ARK-2、GIRK-1が前頭前野で増加しなくなり、上記の仮説を支持する結果と考えた。

G蛋白 β 1 subunitの変化と逆耐性現象の関係をmRNA、蛋白レベルで確認したので、次年度以降は、G蛋白 β 1 subunitの発現をアンチセンス法で抑制したラットについて、MAP逆耐性の形成を検討する。

(2) メタンフェタミン急性、慢性投与による脳内コルチコステロン受容体 mRNA の変化
—逆耐性形成への感受性が異なる近交系ラットを用いた検討— (佐藤光源)

副腎摘出で逆耐性の形成が阻止される、グルココルチコイド合成阻害薬でコカイン逆耐性が阻止される、グルココルチコイドの慢性投与でアンフェタミンへの過敏反応性が形成される、などの報告がある。このため、MAP逆耐性に対する遺伝的な個体差から、脳内コルチコステロン受容体に特異的な変化が生じるか、脳グルココルチコイド受容体 (GR) mRNA の発現量をノーザンブロット法で検討した。逆耐性が起こりにくく、視床下部—下垂体—副腎系 (HPA-axis) の反応性が大きい近交系ラット (Fischer 344) と、逆耐性が起こりやすく、HPA-axis の反応性が小さい近交系ラット (Lewis) で比較したところ、MAP慢性投与に伴い、Fischer 344 では線条体で GR mRNA が増加していた。この系では MAP慢性投与で HPA を介した負の feedback がかかり、コルチコステロンが減少し、それが GR mRNA を増加させ、逆耐性を遅延させると考えた。Lewis では Fischer 344 とは全く逆の成績が得られた。

MAP慢性投与で脳内 heat shock protein (HSP) 90 mRNA は線条体、海馬、小脳で増加、Lewis は減少しており、MAP反復投与中の直腸温の推移と平行していた。

GRは、核内移行→DNA上の応答配列との結合を介して下流の遺伝子の転写を調節する。上記の結果は、MAP投与で、脳部位特異的に線条体でGRの量が増加し、これが逆耐性の個体差に関係する遺伝子の発現に影響を与える可能性を示唆している。そこで、コルチコステロン応答性、遺伝子発現の長期持続性変化に関連するDNAメチラーゼに着目した。DNAメチラーゼ mRNA は、MAP逆耐性形成後、やはり部位特異的に尾状核、側坐核においてF344で増加、Lewisで減少していた。

次年度以降は、今回観察された線条体DNAメチラーゼ mRNA のMAP投与に伴う変化の機能的意義を明らかにするため、MAP投与ラット脳におけるDNAメチル化の変化を検討する。もしポジティブであれば、メチル化に差のある部位の下流に存在する遺伝子が逆耐性の形成しやすさに関連する可能性があるため、メチル化が異なる遺伝子断片を単離する方法であるRestriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法でクローニングを試みる。

(3) メタンフェタミンに応答する新規遺伝子の単離とその行動感作形成への関与についての検討 (梶井 靖)

ラットでは、生後21日の前後でメタンフェタミン (MAP) 逆耐性の形成が左右される。この前後で、MAPに反応して出現する遺伝子群を比較し、逆耐性が形成される生後21日以降だけに現れる遺伝子、つまり逆耐性に特異的な遺伝子を特定することを目的とした。

このため、逆耐性が起きる生後発達の臨界期を境に、MAP急性投与で脳内発現が変化する候補遺伝子をRNAフィンガープリント法で単離した。これらの遺伝子のmRNAが、上記の臨界期の前後で変化するか、定量的なRT-PCR法で調べたところ、3つの候補遺伝子(mrt 1, 2 and 3)が見つかり、その全長を決定した。昨年度、今年度はmrt 1に関して詳細な検討を行った。

定量的RT-PCR法の結果、MAP急性投与で大脳新皮質のmrt 1 mRNA量は臨界期前では変化せず、臨界期後に初めてmRNAが増加した。従ってmrt 1は、逆耐性が形成される臨界期を境に、MAPにより脳内に発現する未知の遺伝子であることが示された。mrt 1遺伝子上の2種類の断片をプローブとしてノーザンブロットを行ったところ、オルタナティブスプライシングによって長短4種のmRNAが転写されることが明らかとなった。この2種のmRNAからは、それぞれ526個、539個のアミノ酸から成る相同性の高い蛋白質が翻訳された。一次構造は、双方ともN末端にグリシンに富む部位をもち、一方でのみC末端にグルタミン酸に富む部位(=転写制御因子の可能性ある)を認めた。

mrt 1から生じる2種の蛋白質の、逆耐性形成に及ぼす影響を調べるため、アンチセンスオリゴヌクレオチドを浸透圧ポンプで脳内に持続注入して蛋白質の発現を阻害した条件下でMAPを反復投与し、行動変化を観察した。前者の蛋白質に特異的なアンチセンス注入下では、MAP反復投与による行動変化は生じなかった。これに対して、C末端にグルタミン酸に富む部位をもつ蛋白質に特異的なアンチセンスは、逆耐性の形成を阻止した。従って、mrt 1から生じる2種の蛋白質の内、一方が逆耐性の形成に密接に関与していることが明らかにされた。

Mrt 1蛋白質の内在性の存在を確認するため、N末端15aaに特異的な抗体を作成した。ウェスタンブロット法で、蛋白質発現ベクターで大腸菌に発現させたMrt 1と、ラット大脳皮質から抽出した蛋白質分画の両者で同サイズのバンドを検出し、今回発見した遺伝子が、ラットの脳で確かに発現していることを見出した。

次年度以降は、MAP連続投与時のmrt 1 mRNAの脳内各部位における発現変化、Mrt 1蛋白質のMAP応答性の細胞内情報伝達機構に果たす役割に関して検索する。同時にヒトでmrt 1遺伝子のホモログをクローニングし、患者に突然変異があるかどうかを検討する。mrt 2、3についても同様の検討を行う。

[今年度の成果と今後の課題]

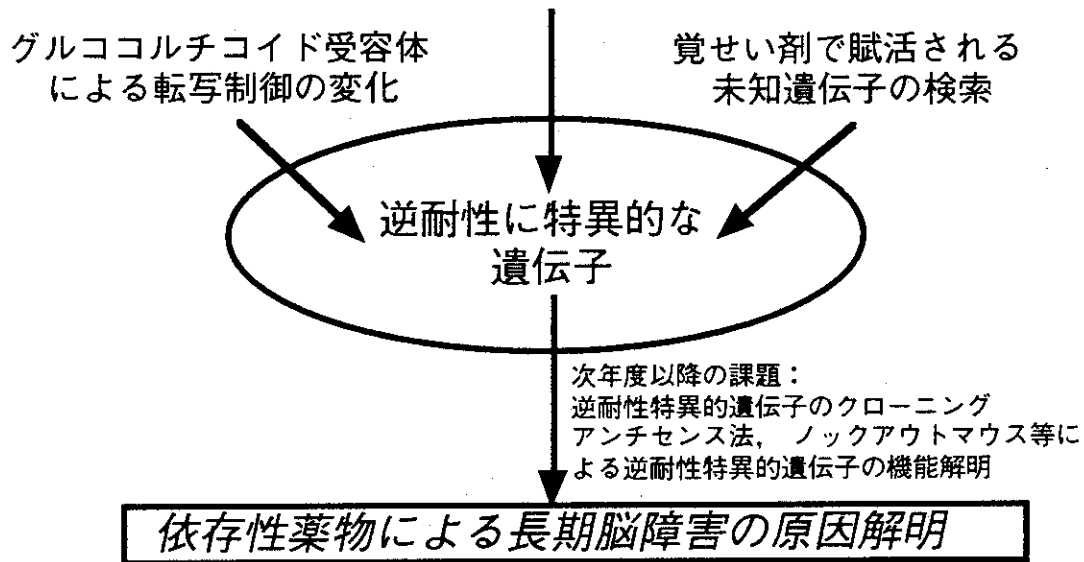
各研究課題に関する今年度の成果は、以下の通りである。

- (1) G蛋白質共役型受容体の機能変化
逆耐性形成後にMAPを再注射しても、中脳腹側被蓋野でG蛋白質 β 1 subunit mRNAの発現と、G蛋白質 β 1 subunitの合成が認められなくなる。
- (2) 脳コルチコステロン受容体の変化
線条体GR、MR mRNAの発現が低い系統のラットが逆耐性を形成しやすい。それには、DNAのメチル化が関連する可能性がある。
- (3) 逆耐性現象に関係する新規遺伝子の単離
Methamphetamine-related transcript (mrt) を単離し、遺伝子の構造を決定。特異的抗体を作成し、予想されるサイズの蛋白質が内在性に存在することを確認。アンチセンス法により、逆耐性の形成に特異的に関係する遺伝子であることがわかった。今後、この新規遺伝子の脳内分布を解明する。

次年度以降は、G 蛋白質共役型受容体を介した細胞内情報伝達系の変化、コルチコステロン受容体を介する転写制御の変化、覚せい剤で賦活される未知遺伝子の検索、等の研究から、逆耐性の形成に特異的に関わる未知の遺伝子を明らかにし、乱用薬物の長期乱用による脳障害（覚せい剤精神病とその再発しやすさ）の臨床研究に道を開く。

厚生科学研究費補助金脳科学研究事業
依存性薬物による脳内薬物受容体の機能変化に関する分子生物学的研究
(主任研究者 東北大学精神医学教室 佐藤光源)
平成10年度研究成果と将来展望

G 蛋白質共役型受容体を介した細胞内情報伝達系の変化



2. 平成10年度 分担研究報告

逆耐性獲得機構におけるG蛋白質介在脳内薬物受容体伝達系 の変化に関する研究

—メタンフェタミン投与動物におけるG蛋白質エフェクターの発現の変化について—

分担研究者: 菊池 周一

国立精神・神経センター 精神保健研究所 薬物依存研究部

(研究要旨)

G蛋白質は受容体と共役して細胞内のエフェクターに情報を収束・発散して伝達する。昨年度、本研究では、メタンフェタミン慢性投与による行動感作において、側坐核および腹側被蓋野におけるG蛋白質の $\beta 1$ サブユニットのmRNA発現の変動が重要であることを明らかにした。今年度はG蛋白質 $\beta \gamma$ サブユニットの蛋白レベルでの発現およびそのエフェクターのG-protein-gated inward rectifier potassium channel (GIRK) および Ras の発現を免疫組織学的手法を用いて検討した。その結果、1) メタンフェタミンの急性薬理効果と側坐核および腹側被蓋野の $\beta 1$ および $\gamma 3$ サブユニット蛋白の発現細胞数の増大、2) 行動感作後においては腹側被蓋野における $\beta 1$ 蛋白の発現細胞数の発現増大の消失、3) 急性投与による前頭前皮質のGIRK1の発現増大と慢性投与後の発現増大の消失、4) 行動感作成立の有無に関わらずメタンフェタミン投与後一過性のRas発現細胞数の減少、が観察された。以上の結果から、メタンフェタミンによる行動感作の形成機序において、 $\beta \gamma$ サブユニットおよびそのエフェクターを介する経路が発現の変化を伴って複合的に障害されていることが示唆された。また、それぞれのエフェクターの経路は異なる効果を有するすると考えられ、メタンフェタミンによる行動感作に重要な意義を有することが考えられた。

A.研究目的

覚せい剤(メタンフェタミン、以下MAP)の長期乱用により、精神分裂病類似の精神症状を発現する。さらに、休薬しても少量の再使用や飲酒、ストレスなどにより再発を繰り返す。このモデルとして動物にMAPを反復投与すると行動感作が成立し、休薬しても再投与により増強された行動が再現される。行動感作の獲得、維持機構については、これまでドーパミン系などの知見が有力であるが、ドーパミン受容体など多くは7回膜貫通型受容体であり、三量体G蛋白質に共役している。1,2)

三量体G蛋白質は $\alpha \beta \gamma$ のヘテロトリマーであり、受容体から情報が三量

体G蛋白質に伝達されると α と $\beta \gamma$ サブユニットに解離してそれぞれ細胞内エフェクターへと情報を伝達する。 α サブユニットについては $G_{i2} \alpha$ および $G_{o} \alpha$ の変化が海馬³⁾や線条体⁴⁾で報告されている。最近の研究からさらに $\beta \gamma$ サブユニットは低分子量G蛋白質を介して転写制御に関与したり¹⁾、カリウムチャンネルにリンクすることが解明されてきた⁵⁾。昨年度われわれは、MAP急性および慢性投与動物におけるG蛋白質 $\beta \gamma$ サブユニットの発現の変化をin situ hybridization法を用いて検討し、メタンフェタミンによる行動感作には、腹側被蓋野および側坐核における $\beta 1$ サブユニットmRNAの発現の変動が重要であること

を報告した。しかし、 $\beta\gamma$ サブユニットの蛋白質発現やその多様なエフェクターの変化については未だ知られていない。本年度は、 $\beta\gamma$ サブユニットおよびそのエフェクターが行動感作形成および維持機構にいかなる意義を有するかを解明するために、これまで変動の認められた $\beta 1$ サブユニットをはじめとするいくつかのサブクラスを蛋白レベルで発現を検討した。さらに、G蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットの細胞内のエフェクターであるG-protein-gated inward rectifier potassium channel (GIRK1およびGIRK2)の発現や、 $\beta\gamma$ サブユニットが関与するMAPキナーゼカスケードを制御する低分子量G蛋白質Rasの発現について検討した。

B. 研究方法

1. 動物モデル作製

成年雄性Sprague-Dawley ラット(260-320 g)82匹を用い、温度、湿度は一定に保持し、12時間明暗周期下で飼料・水は自由に摂取できるような環境下(EBAC-S, 日本クレア、東京)で飼育した。動物の取扱にはNIHガイドラインを参考に倫理面に配慮した。MAP(ヒロポン、大日本製薬)は5mg/kg/ml生理食塩水に溶解し、人肌温に加温後、10時から12時の間に1日1回反復腹腔内投与した。行動感作を評価するため、投与後の常同行動を指標に、15分-30分毎の行動を投薬内容を知らない2名が氏家ら⁵⁾による行動評価法²⁾を用いて評価した。

2. 群

MAP逆耐性獲得ラットはMAP 5mg/kg/mlを2週間連続投与した。最終投与後4-8週間放置した後、MAP(MM群, n=12)または生理食塩水(MS群, n=12)を再投与した。また、対照群(SS群, n=12)は生理食塩水を同一条件、同一時期に投与した。急性投与群(SM群, n=12)は生理食塩水を2週間連続投与した後4-8週間放置し、1回のみMAP 5mg/kg/mlを再投与した。分析は各群とも再投与後3時間、6時間、24時間、1週間後(各n=3)の時点で行った。

3. 標本作製

ラットをネンブタール麻酔し、PBSで灌流後、4%パラホルムアルデヒド液で灌流しさらに脳を2-3mm厚の切片にした後、5時間2回浸漬固定した。PBSで洗浄後、アルコール系列にて脱水し、キシレンにて透徹した後パラフィン包埋した。ミクロトームにて4 μ m厚にスライスし、シランコートスライドガラスに貼付し、免疫組織学的検索に供した。

4. 抗体

いずれもanti-mouse rabbit antibody (Ras以外はpolyclonal antibody)を使用した。抗G $\beta 1$ 抗体、抗G $\beta 2$ 抗体、抗G $\gamma 1$ 抗体、抗G $\gamma 3$ 抗体はそれぞれSantacruz社(米国)より購入した。また、抗GIRK1抗体、抗GIRK2抗体はAlomon社(米国)より購入した。抗pan Ras (H-, K-, N-Ras)抗体(monoclonal antibody)はBoehringer Mannheim社(独)より購入した。抗体の妥当性についてウエスタンブロッティングにより検討した。

5. SDS-PAGE

脳をen blocで採取しサンプルバッファー(0.05M Tris-HCl (pH 6.8)、2% SDS、6% β メルカプトエタノール、10%グリセロール、BPB)を99 $^{\circ}$ C、3分間加熱した後、電気泳動(20mA定電流)を行った。固定後、一部はCBB染色に供した。

6. ウエスタンブロッティング

電気泳動後、ゲルをブロッティングバッファー中でナイロンメンブレンに定電圧60V、4時間で転写した。終了後、PBSで洗浄し使用まで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

7. 酵素抗体(AP)法

クエン酸緩衝液中でオートクレーブにより抗原を賦活させた後、ブロッキング溶液中で室温で1時間インキュベートした。一次抗体中で室温1時間インキュベートした後、PBSで洗浄し、二次抗体anti-rabbit AP-conjugated F(ab)₂ fragmentと反応した。AP発色バッファーで親和させた後、NBT/BCIPにて発色した。

8. ABC法(ABC elite kit, Vector)

0.3% H₂O₂処理後、一晩一次抗体と反応させた。ビオチン標識二次抗体溶液でインキュベート後、ABC溶液にて反応させ、ペ

ルオキシダーゼ基質 (DABまたはDAB+Nickel) で発色した。

C. 結果

1. ウェスタンブロッティングの結果

抗体の妥当性を検討するために、ウェスタンブロッティングにより目的蛋白質のバンドを検出した (Fig. 1)。

2. G蛋白質βサブユニット発現の変化

側坐核におけるβ1サブユニット蛋白質の発現は、急性投与群(SM)で最終投与後24時間後(Fig. 2)において対照群(SS)と比較して発現細胞数が増大していた。また、その変化は1週間後には消失していた。また、MM群においてβ1サブユニット蛋白質発現細胞数が最終投与後24時間後(Fig. 2)において増大していたが、1週間後には発現は対照群と同程度であった。腹側被蓋野においては、SM群では増大が陽性細胞数が増大したが、MM群ではMS群と同様に対照群と同程度であった。前頭前皮質ではいずれの群においても変動を認めなかった。また、β2サブユニットはいずれの群、時点、部位においても発現の変動は認められなかった。

3. G蛋白質γサブユニット発現の変化

γ1サブユニットの発現は、側坐核、腹側被蓋野、前頭前皮質のいずれにおいても変動を認めなかった。また、γ3サブユニット蛋白質の発現は、側坐核においてSM群で最終投与後24時間後 (Fig.3) に発現細胞数が増大していたが、その変化は1週間後には消失していた。また、MM群においてγ3サブユニット発現細胞数が最終投与後24時間後 (Fig. 3) において増大していたが、1週間後には発現は対照群と同程度であった。腹側被蓋野においては、SM群、MM群で陽性細胞数が増大したが、MS群では対照群と同程度であった。前頭前皮質ではγ3はいずれの群においても変動を認めなかった。

4. GIRK1およびGIRK2の変化

GIRK1の発現は、前頭前皮質においてSM群で最終投与後24時間後 (Fig.4) に発現細胞数が増大していたが、その変化は1週間後には消失していた。側坐核、腹側被蓋

野においては発現の変動を認めなかった (Fig.4)。また、GIRK2の発現細胞数は前頭前皮質においていずれの群においても変動を認めなかった。腹側被蓋野、側坐核の発現は少量であり、今回は検討から除外した。

5. Ras発現の変化

Ras蛋白質は側坐核で急性投与群(SM)で最終投与後24時間後 (Fig. 5) においてSS群と比較して発現細胞数がほとんど認められなかった。また、MM群においてもRas蛋白質発現細胞数が最終投与後24時間後において減少していた (Fig. 5)。MS群ではRas蛋白質の発現は対照群と同程度であった。

D. 考察

本年度の研究から、行動感作形成の有無に関わらず急性(再)投与により側坐核においてβ1およびγ3蛋白質の発現の増大が認められた。この所見はMAPの再投与をした群には認められ、行動感作を維持しているMS群では認められなかったことから、MAPの急性薬理効果と考えられる。側坐核におけるG蛋白質の意義については、百日咳毒素を側坐核に微量注入してG蛋白質の機能を抑制した実験があり、コカイン慢性投与による強化がみとめられなかったとの報告がある⁶⁾。百日咳毒素はαとβγサブユニットの解離を妨げ活性を抑制することから、αだけでなくβγを介する細胞内伝達系が強化の形成に関連していることが予想される。本研究結果を併せると、G蛋白質を介する系が強化に重要な意義を有する可能性が考えられた。

一方、腹側被蓋野においては、行動感作後にβ1はMAP急性投与では認められた発現増大の変化が消失していた。この変化はMS群では認められないことから、行動感作形成後に認められる細胞応答の機能的変化と考えられる。一方、γ3では急性投与でも再投与でも増大しており、この所見は急性効果と考えられる。β1の変化との解離の理由は不明であるが、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどを局所に投与して発現をサブユニットごとに制御することにより、さら

に役割が明らかになると思われる。

発現に変化の認められた $\beta 1$ と $\gamma 3$ は α サブユニットとともに三量体G蛋白質として機能することが知られている。この組み合わせとリンクする受容体としてはソマトスタチン受容体¹⁾が知られている。ソマトスタチン受容体は移所運動の増強の機序に関与していると言われている。⁷⁾ 一方、行動感作は環境の影響を受けやすく、行動感作には環境因により移所運動か常同行動のいずれかが増強するとの見解がある。⁸⁾ 今回認められた分子発現の変化は、常同行動を指標とした場合に認められたが、部位を考慮すると移所運動との関連も想定され、共通の分子基盤として $\beta \gamma$ の変化は興味深いと思われる。

GIRKはこれまで心筋でムスカリニックアセチルコリン受容体とリンクすることが知られていたが、脳における詳細は不明のままであった。最近、GIRK1とドーパミンD2受容体およびドーパミンD4受容体との共役が報告され⁹⁾、さらにオピオイド受容体との共役も報告されている¹⁰⁾。これらの受容体は行動感作に重要と考えられており、GIRK1の変化が急性投与時のみに認められ、慢性投与後は認められなくなっていることは、行動感作に伴う重要な変化であると考えられる。特に前頭前皮質において認められたことは強化や移所運動の増強のみならず常同行動の増強にGIRK1発現が関係していることを示唆していると思われる。GIRK2については今回は側坐核や腹側被蓋野では発現量が少なく検討できなかった。ドーパミンD3およびD2L受容体との共役が*in vitro*で報告されているが¹¹⁾、前頭前皮質においては、GIRK1とは異なり発現は不変であった。

Ras蛋白質はMAP(Mitogen-activated protein)キナーゼカスケードを活性化する一分子であり、G蛋白質共役受容体(5-HT2B受容体¹²⁾、ムスカリニックアセチルコリン受容体¹³⁾など)を介してG $\beta \gamma$ サブユニットがRasを間接的に活性化する。RasはRafと結合してMAPキナーゼに至る系を活性化し遺伝子発現に影響を及

す。主に細胞の増殖、分化に関わるが、Rasはひとつはoncogeneと考えられ細胞死を抑制すると言われている。本研究では、このRas蛋白質の発現が側坐核および前頭前皮質において行動感作の有無に関わらず、急性(再)投与により減少した。この所見がただちに細胞死とは結びつかないまでも、覚せい剤の薬理効果により神経の形態変化を惹起されることとなんらかの関係があるかもしれない。細胞死やmicrotubuleの発現などと併せてさらに検討する必要がある。

E. 結論

覚せい剤特にメタンフェタミンによる行動感作の成立においてG蛋白質 $\beta \gamma$ サブユニットおよびそのエフェクターの変化が重要であることを述べた。持続的な分子変化はみとめられていないが、再投与時により潜在する遺伝子発現応答の変化が多種多様な分子に惹起されることが明らかになった。今後これらの分子の機能的な側面に焦点を当てて検討していく。

参考文献

1. Clapham, DE, Neer, EJ ; G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:167-203.1997.
2. Ujike, H, Onoue, T, Akiyama, K, Hamamura, T, Otsuki, S , Effects of selective D-1 and D-2 dopamine antagonists on development of methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Psychopharmacology* .98. 89-92. 1989
3. 氏家 寛、秋山一史、石原武士、清水義雄、黒田重利 ; Methamphetamine逆耐性動物での G 蛋白 mRNA の変化. 厚生科学研究補助金(麻薬等対策総合研究事業)薬物依存における脳性障害発現機序に関する研究(主任研究者 佐藤光源).平成6年度研究報告書
4. Hiroto Iwasa, Shuichi Kikuchi, Kaori Suzuki, Shuji Hasegawa, Keijiro Koseki and Toshio Sato. Alteration of G proteins subclass mRNA levels in the methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Ann NY Acad Sci.* 801, 110-115.1996.
5. Ivanova-Nikolova, TT, Breitwieser, GE Effector Contributions to $G\beta\gamma$ -mediated Signaling as Revealed by Muscarinic Potassium Channel Gating. *J GEN PHYSIOL.* 109. 245-253. 1997
6. Self, D. W., Terwillinger, R. Z., Nestler, E. J., Stein, L., Inactivation of G_i and G_o proteins in nucleus accumbens reduces both cocaine and heroin reinforcement. *J Neurosci* 14. 6239-6247.1994
7. Raynor K, Lucki I, Reisine T; Somatostatin receptors in the nucleus accumbens selectively mediate the stimulatory effect of somatostatin on locomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993 Apr;265(1):67-73
8. 大森哲郎、安部川智浩、伊藤耕一、小山司 ; Context-dependent sensitization について—再考と仮説—日本神経精神薬理学雑誌17,61-68,1997.
9. Pillai G, et al.; Human D2 and D4 dopamine receptors couple through betagamma G-protein subunits to inwardly rectifying K^+ channels (GIRK1) in a *Xenopus* oocyte expression system: selective antagonism by L-741,626 and L-745,870 respectively. *Neuropharmacology.* 1998 Aug;37(8):983-7.
10. Darlison MG, et al.; Opioid receptors from a lower vertebrate (*Catostomus commersoni*): sequence, pharmacology, coupling to a G-protein-gated inward-rectifying potassium channel (GIRK1), and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 22;94(15):8214-9.
11. Kuzhikandathil EV, Yu W, Oxford GS; Human dopamine D3 and D2L receptors couple to inward rectifier potassium channels in mammalian cell lines. *Mol Cell Neurosci* 1998 Dec;12(6):390-402
12. Launay JM, et al ; Ras involvement in signal transduction by the serotonin 5-HT2B receptor. *J Biol Chem.* 1996 Feb 9;271(6):3141-7.
13. Mattingly, RR, macara, IG, Phosphorylation - dependent activation of the Ras-GRF/CDC25M exchange factor by muscarinic receptors and G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature.* 382.268-272.1996

F. 研究業績

1. Shuichi Kikuchi Changes in gene transcript expression of G protein beta and gamma subunits in methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Neurosci Res* (1998), Supl 22, (365).
2. Kikuchi S, Iwasa H, Miyagishima H, and Hasegawa S; Increases in NMDAR1 mRNA levels are involved in the generation of local afterdischarges in amygdaloid-kindled rats. *Epilepsia* 39 (1998) Supl 5, (73).
3. Iwasa,H, Miyagishima,H, Kikuchi S, et al. The apoptotic brain damages and the changes in expression level of Bax in experimental models of epilepsy . *Neurosci Res* (1998) Supl 22. (337)
4. Iwasa,H, Kikuchi,S, Miyagishima,H, Mine, S, Koseki,K, Hasegawa,S ; Altered expression levels of G protein subclass mRNAs in various seizure stages of the kindling model. *Brain Res.* 818.570-4.
5. 渡辺博幸、岩佐博人、宮城島大、菊池 周一、峯清一郎、大賀優、古関啓二郎；てんかん原性獲得機構におけるアポトーシスの意義 てんかん治療研究振興財団研究年報(1998).10.(23-29).
6. 菊池 周一、和田清；注射薬物使用者におけるHIV感染リスクの低減。(翻訳)(山崎修道、木原正博監訳)エイズパンデミック, 233-235,日本学会事務センター,東京, 1998.
原典 Mann,J, and Tarantola,D eds ; *AIDS in the World II*, Jarlais,DCD,Friedman,SR, Risk reduction among injecting drug users. Oxford University Press, New York, 1996.
7. Kikuchi,S, Iwasa, H, Wada,K ; Changes in expression level of GTP-binding protein beta subunit messenger RNA in behavioral sensitization to methamphetamine. 21th Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum,, Glasgow, UK, 1998.7.
8. 菊池周一、岩佐博人、宮城島大、山木雅高、和田清；メタンフェタミンによる逆耐性獲得機構とG蛋白質βγサブユニット発現の変化。第21回日本神経科学神経化学合同大会, 東京, 1998.
9. 菊池周一、山木雅高、平岩智瑞、和田清、岩佐博人、宮城島大；メタンフェタミン投与による逆耐性獲得機構におけるG蛋白質βγサブユニット発現の変動。第982回千葉医学会例会第16回千葉精神科集談会,千葉, 1999, 1.
10. 菊池周一、岩佐博人、宮城島大；てんかんにおけるアポトーシス関連遺伝子産物の変化－キンドリングモデルにおけるbcl-2,bax発現を中心に－第982回千葉医学会例会第16回千葉精神科集談会, 千葉, 1999, 1.
11. 菊池周一、山木雅高、平岩智瑞、岩佐博人、田中陽子、笠置泰史、和田清；覚せい剤精神病の再発脆弱性に関する実験的研究－G蛋白質の関与について。平成10年度精神保健研究所研究報告会, 1998, 3.
12. 岩佐博人、宮城島大、菊池周一、峯清一郎、大賀優；てんかん原性獲得過程と発作発現機構におけるアポトーシスおよびBaxの発現について。第21回日本神経科学神経化学合同大会, 東京, 1998, 9.
13. 岩佐博人、宮城島大、菊池周一、峯清一郎、山浦晶、岡信夫、長谷川修司；てんかんにおけるアポトーシス発現とその関連遺伝子の変動－ヒト側頭葉てんかん焦点切除組織およびキンドリングモデルを用いた検討－第32回日本てんかん学会, 横浜, 1998,10.
14. 宮城島大、岩佐博人、渡辺博幸、菊池周一；てんかん原性獲得におけるapoptotic brain changeについて－キンドリング発作発展段階における変化－第982回千葉医学会例会第16回千葉精神科集談会, 千葉, 1999, 1.
15. H. Iwasa, S. Kikuchi, H. Miyagishima, H. Watanabe, M. Ohga, S. Mine and S. Hasegawa ; The contribution of apoptotic cell death in kindling-associated epileptogenesis and drug-induced epileptic seizures. 21th Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Glasgow, UK, 1998.7.

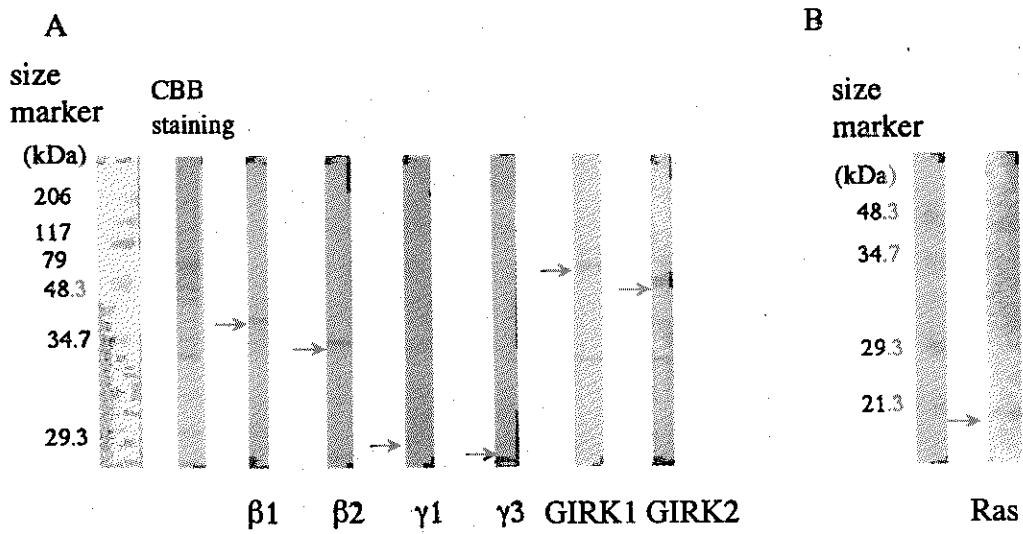


Fig. 1

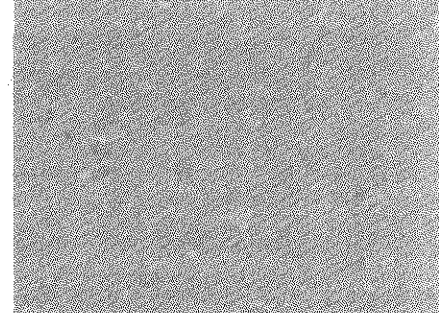
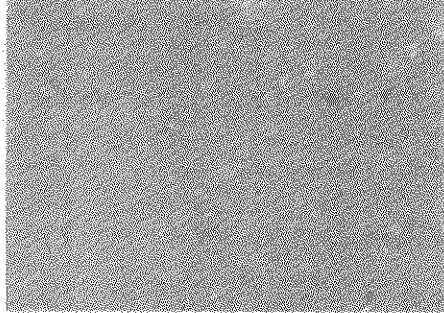
G β 1 subunit

NA

VTA

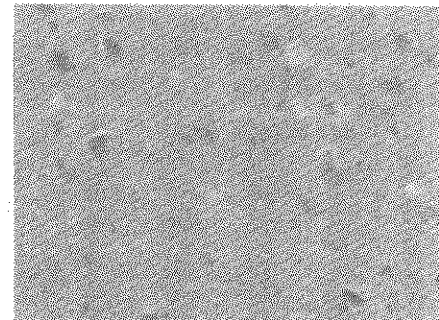
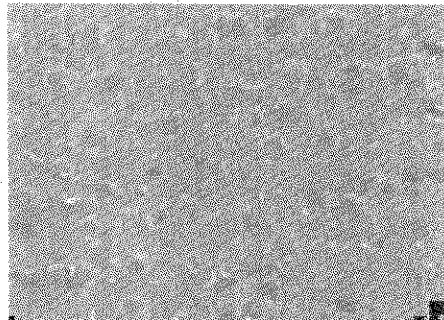
SS

SS



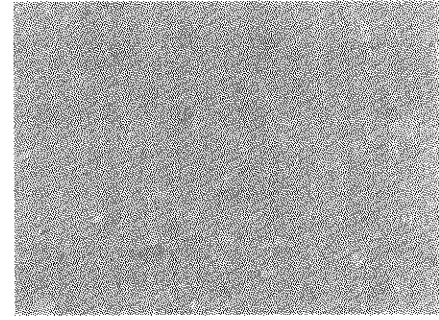
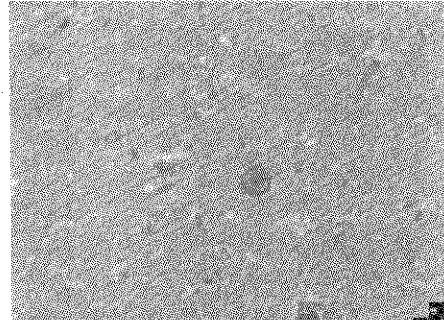
SM

SM



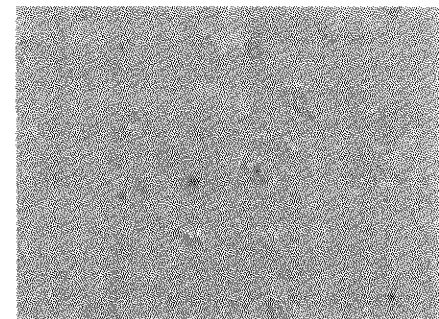
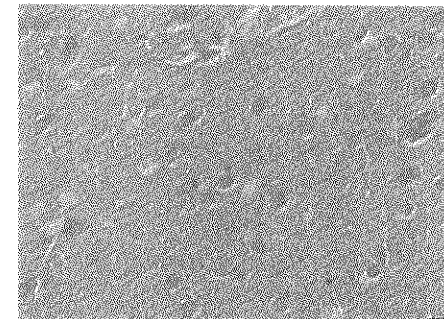
MS

MS



MM

MM



**×100
DAB**

Fig. 2

G γ 3 subunit

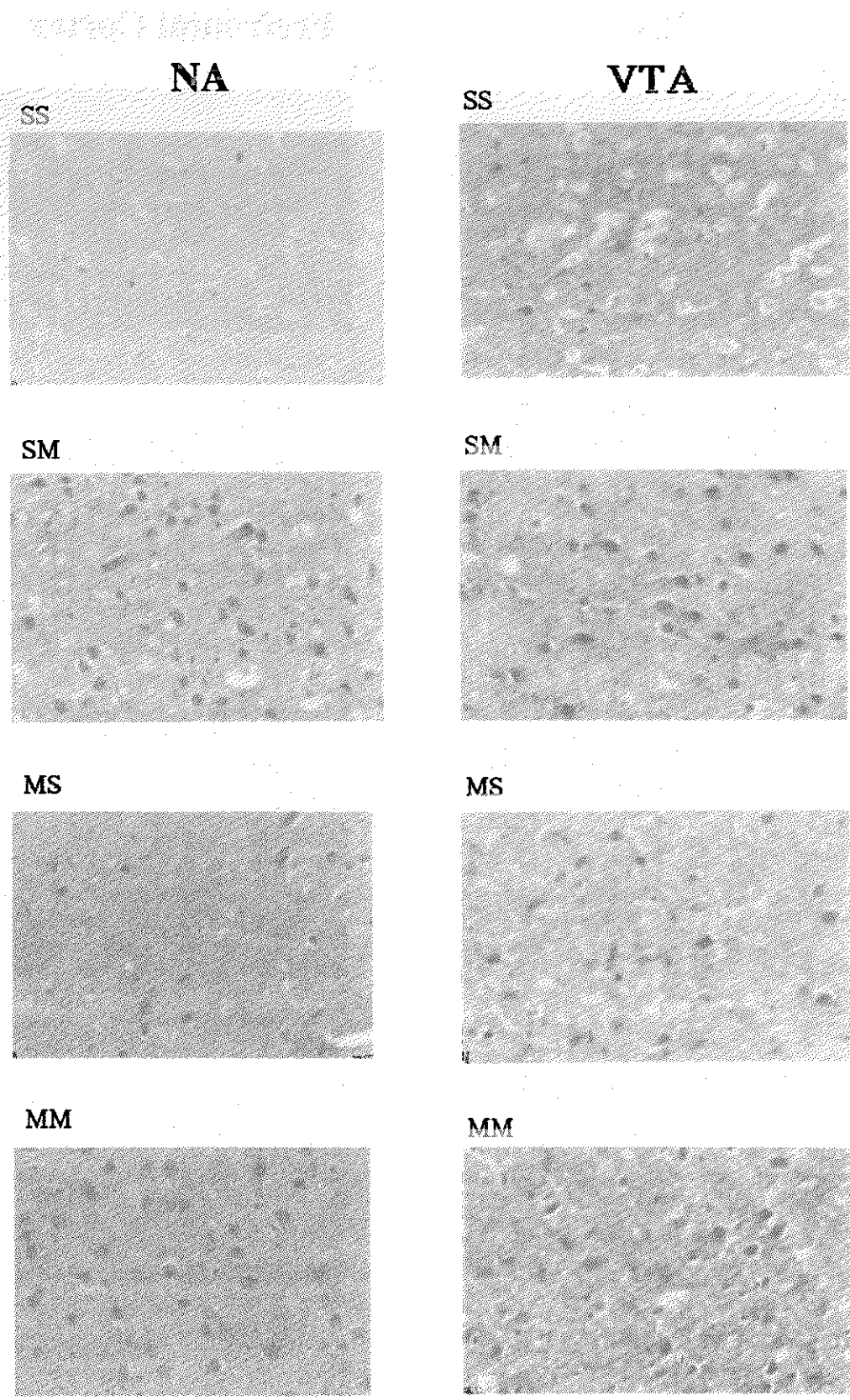
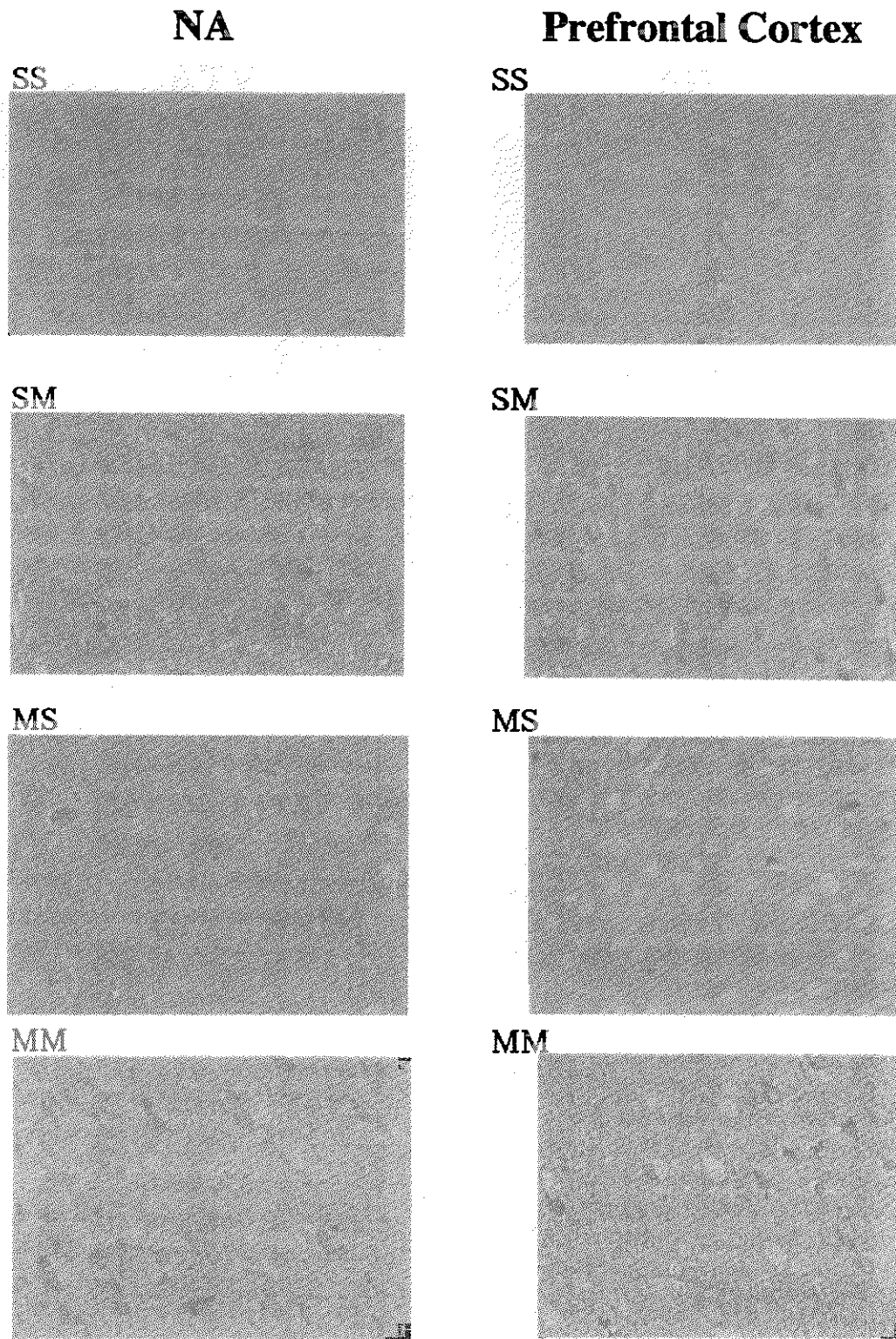


Fig. 3

x100
DAB+Nickel

GIRK-1

Wang et al. 2003



x100
DAB+Nickel

Fig. 4

pan-Ras

NA

Cerebral Cortex

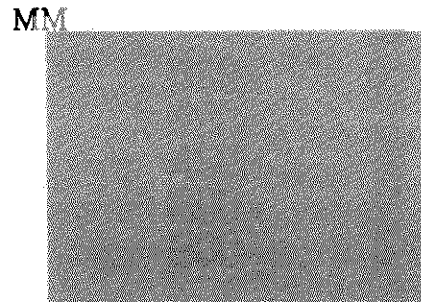
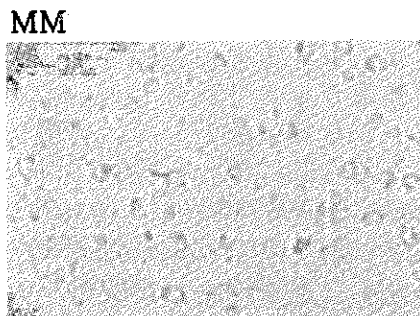
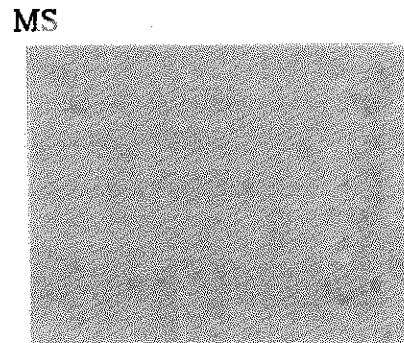
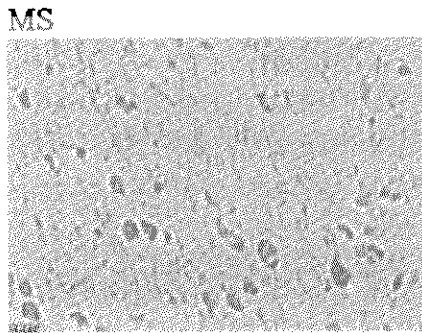
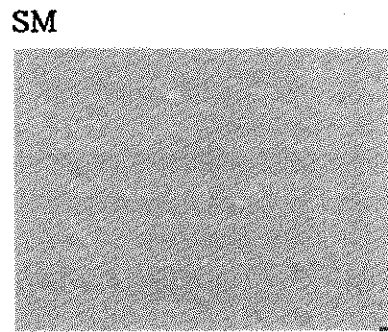
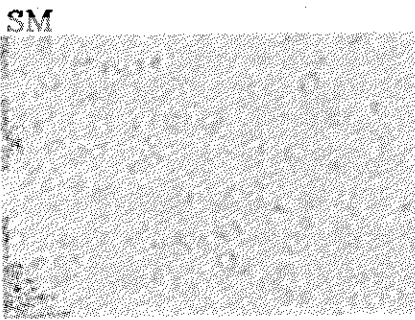
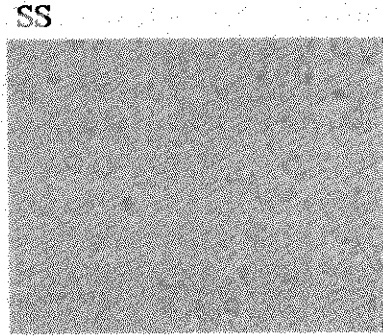
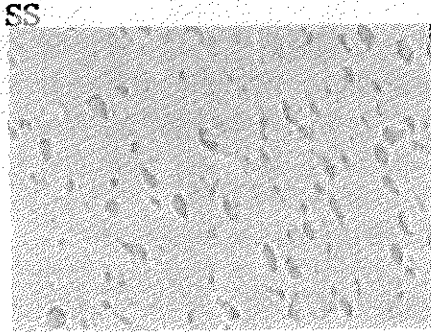


Fig. 5

x100
NBT/BCIP