

3. Nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現に及ぼす電位依存性 Ca²⁺チャンネル (VDCCs) 阻害薬の影響

神経細胞膜脱分極が nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現に関与している可能性が高く、しかも nAChR 活性化に伴う神経細胞機能の変化の1つが細胞内への Ca²⁺流入であることから、次に VDCCs の関与について、VDCC 阻害薬の nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現への影響を調べた。L 型 VDCCs 阻害薬の nifedipine は有意に nicotine による DBI mRNA 発現を阻害した (Fig. 3)。一方、それぞれ P/Q および N 型 VDCCs 阻害薬である ω -agatoxin VIA (ω -ATX) および ω -conotoxin GIVA (ω -CTX) はいずれも nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現に影響を与えなかった (Fig. 3)。これらの結果から、nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現には L 型 VDCCs を介して生じる神経細胞内への Ca²⁺流入が関与していることが明らかとなった。

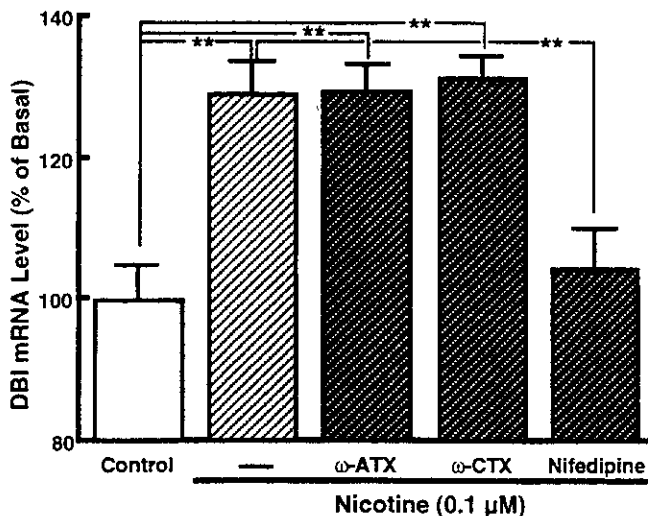


Fig.3 Effects of various inhibitors of VDCCs on nicotine-induced DBI mRNA expression. Each value represent the mean \pm S.E.M. obtained from 4 separate experiments. ** $p < 0.01$ (Bonferroni's test). Drug concentrations: ω -ATX; 1 μ M, ω -CTX; 1 μ M, nifedipine; 1 μ M.

4. Calmodulin 拮抗薬および Ca²⁺/calmodulin-dependent

protein kinase (CAM II kinase)阻害薬の nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現に及ぼす影響

前項の実験成績から、calmodulin 拮抗薬である W-7 および CAM II kinase 阻害薬である KN-62 の nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現に及ぼす影響を検討したところ、Fig. 4 に示すように、これら両薬物は用量依存性に nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現を抑制することが観察された。

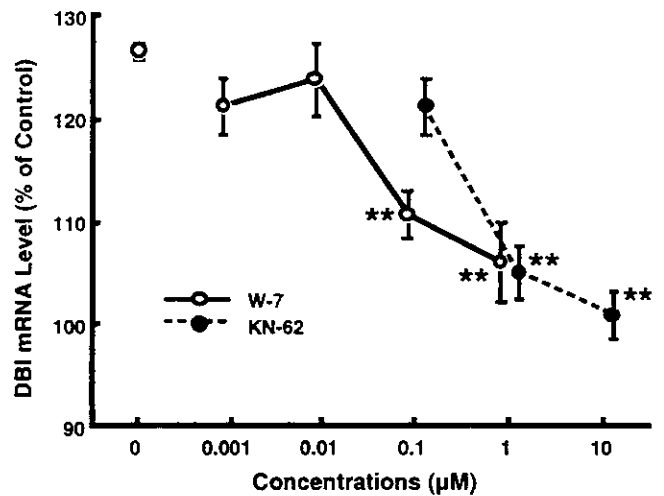


Fig.4 Effects of N-7 and KN-62 on nicotine-induced DBI mRNA expression. Each value represent the mean \pm S.E.M. obtained from 4 separate experiments ** $p < 0.01$ (Bonferroni's test).

D. 考察

Nicotine の長期曝露に伴い初代培養マウス大脳皮質神経細胞における DBI mRNA 発現が増加することが本研究により確認された。すでに報告⁷⁾されているように、この DBI mRNA 発現の増加には nicotine の曝露時間として 24 時間が必要であり、一方、15 分あるいは 1 時間の曝露では DBI mRNA 発現が生じないことが観察された。同様に、マウスに 7 日以上連続して nicotine を投与した場合にみ大脳皮質に発現がみられ、単回の nicotine の投与では生じないことがすでに報告されて

いる⁸⁾。従って、DBI mRNA 発現には長期の神経細胞への nicotine 曝露が必須の条件であることが明らかとなった。

Nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現が nAChR 拮抗薬である hexamethonium の共存により完全に消失したことから、この発現には nAChR の活性化が関与していることは確実であると考えられる。しかも、神経細胞膜脱分極阻害作用を有する薬物である TTX、procainamide、dibucaine などのいずれの薬物によっても nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現が完全に阻害されるという本研究の実験成績は、この発現変化には神経細胞膜の脱分極が重要な役割を果たしていることを意味していると考えられる。

神経細胞膜脱分極による細胞内の生化学的変化の1つが、VDCCs の活性化による Ca^{2+} の細胞内への流入であることはよく知られた事実である。従って、本研究では VDCCs のサブタイプのいずれがこの Ca^{2+} 流入に関与しているのかについて、それぞれのサブタイプに選択的な阻害薬を用いて検討を行った。なお、本研究で使用した初代培養マウス大脳皮質神経細胞は、L、P/Q および N 型の VDCCs を有していることはすでに報告されている¹²⁾。その結果、本研究で示したように、L 型 VDCCs 阻害薬である nifedipine のみが nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現を完全に阻害し、それぞれ P/Q および N 型 VDCCs 阻害薬である ω -ATX および ω -CTX は発現変化に何ら影響を与えないことが認められた。このことから、nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現には、nAChR 活性化に付随する神経細胞膜脱分極により VDCCs の活性化が誘発され、この活性化された VDCCs、とくに L 型 VDCCs の開口に伴った Ca^{2+} の細胞内流入が関与しており、一方他の VDCCs サブタイプは機能的に関係していないことが判明した。

細胞内の Ca^{2+} が calmodulin と結合し、 Ca^{2+} /calmodulin 複合体を形成し、ついで CAM II kinase が活性化されることはよく知られている。すでに本研究で示したように、nicotine の長期曝露により誘発される DBI mRNA 発現が L 型 VDCCs 開口により生じることから、nAChR

活性化が最終的に細胞内への Ca^{2+} 流入を増大させ、これが発現に関与している可能性が考えられるため、calmodulin antagonist である W-7 および CAM II kinase 阻害薬である KN-62 を用い、nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現に及ぼす影響を調べた。いずれの薬物も完全に DBI mRNA 発現の増加を抑制したことから、nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現には少なくとも CAM II kinase が関与していることは明らかと考えられる。

E. 結語

薬物依存を起こすことが知られている nicotine の長期曝露により誘発される DBI mRNA 発現の増加の機序について、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用いて検討した。その結果、nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現は、nAChR 活性化による L 型 VDCCs を介した Ca^{2+} の細胞内への流入により、CAM II kinase が活性化されて生じる変化である可能性が示唆される。

F. 参考文献

- 1) Alho H., Costa E., Ferrero P. et al.: Diazepam-binding inhibitor: A neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. *Science* 229: 179-182, 1985.
- 2) Corda M.G., Ferrari M., Guidotti A. et al.: Isolation, purification and partial sequence of a neuropeptide (diazepam binding inhibitor) precursor of an anxiogenic putative ligand for benzodiazepine recognition site. *Neurosci. Lett.* 47: 319-324, 1984.
- 3) Ferrarese C., Alho H., Guidotti A. et al.: Co-localization and co-release of GABA and putative allosteric modulators of GABA receptor. *Neuropharmacol* 26: 1011-1018, 1987.
- 4) Guidotti A.: Role of DBI in brain and its posttranslational processing products in normal and abnormal behavior. *Neuropharmacology* 30: 1425-1433, 1991.
- 5) Guidotti A., Forchetti C.M., Corda M.G. et al.: Isolation, characterization, and population to

- homogeneity of an endogenous poly-peptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 80: 3531-3533, 1983.
- 6) Guidotti A., Toffano G. and Costa E.: An endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 257: 553-555, 1978.
 - 7) Katsura M., Ohkuma S., Chen D.-Z., et al.: Nicotine increases diazepam binding inhibitor (DBI) mRNA in primary cultured neurons. *Neurosci. Lett.* 168: 1-4, 1994.
 - 8) Katsura M., Ohkuma S., Tsujimura A. et al.: Functional involvement of benzodiazepine receptors in ethanol-induced increases of diazepam binding inhibitor (DBI) and its mRNA in the mouse brain. *Mol. Brain Res.* 54: 124-132, 1998.
 - 9) Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 19: 265-275, 1951.
 - 10) Mochetti I., Einstein R. and Brosius J.: Putative diazepam binding inhibitor peptide: cDNA clones from rat. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 7221- 7225, 1986.
 - 11) Ochoa L.E.M.: Nicotine-related brain disorder: the neurobiological basis of nicotine dependence. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14: 195-225, 1994.
 - 12) Ohkuma S., Katsura M., Hibino Y. et al.: Multiple actions of nitric oxide on voltage-dependent Ca^{2+} channels in mouse cerebral cortical neurons. *Mol. Brain Res.* 54: 133-140, 1998.
 - 13) Sargent P.B.: The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 16: 403-443, 1993.
 - 14) Tong T., Toranzo D. and Perretier G.: Localization of diazepam-binding inhibitor (DBI) mRNA in the rat brain by high resolution in situ hybridization. *Neuropeptides* 20: 33-40, 1991.

クローン化オピオイド受容体発現細胞におけるアゴニスト持続的処置による アデニル酸シクラーゼ系の過感受性形成メカニズムに関する検討

分担研究者 佐藤公道

共同研究者 南 雅文、中川貴之、渡辺 豪、小澤 徹
京都大学薬学研究科生体機能解析学分野

研究要旨 麻薬性鎮痛薬による依存形成機構を分子レベルで解明するため、クローン化オピオイド受容体を発現する CHO 細胞を用いて、*in vitro* 系での依存形成のモデルと考えられているアゴニスト持続的処置によるアデニル酸シクラーゼ (AC) 系の過感受性の形成メカニズムについて検討した。AC 系の過感受性はオピオイド受容体サブタイプ (μ 、 δ 、 κ) にかかわらず、比較的短時間 (数分~数時間) のうちに形成された。また、蛋白質合成阻害薬 cycloheximide を用いた検討から、その形成には新たな蛋白質の合成は関与せず、細胞内情報伝達系の機能的な変化が関与していることが示された。さらに、各種プロテインキナーゼ阻害薬はその形成に影響を与えなかった。また、受容体-G 蛋白質連関における変化を GTPase 活性を指標として検討したが、過感受性形成時に GTPase 活性の変化は見られなかった。オピオイド受容体と各種キメラ G 蛋白質 α サブユニット α_{i2}/α_q を共発現させた CHO 細胞を用いて検討した結果、過感受性の形成には α_{i2} の AC との連関に関与する領域 (Met²⁴⁴-Asn³³¹) の存在と機能保持が必要であることが示された。

A. 目的

麻薬性鎮痛薬および関連化合物 (オピエート) の作用点として、これまでに μ 、 δ および κ オピオイド受容体 cDNA がクローニングされ、いずれも G 蛋白質に関連する 7 回膜貫通型の受容体であり、百日咳毒素 (PTX) 感受性 G 蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼ (AC) の抑制、Ca²⁺チャネルの抑制、K⁺チャネルの開口促進などと連関していることが明らかにされている⁵⁾。一方、麻薬性鎮痛薬は、身体的および精神的依存を生じやすく、そのことは臨床における適用を制限するだけでなく、薬物濫用に伴う種々の社会問題の原因ともなっている。麻薬性鎮痛薬による依存形成のメカニズムに関してはいまだ明らかにされていないが、青斑核などの特定の脳部位における AC 系の代償的な過感受性が関与している可能性が指摘されている^{6, 8)}。本研究では、この AC 系の過感受性形成のメカニズムを分子レベ

ルで解明するために、クローン化オピオイド受容体を安定的に発現する培養細胞を *in vitro* でのモデル系として用い、主に、細胞内情報伝達系のどのプロセスでの変化が重要であるのかを、forskolin により誘発される cAMP 蓄積の変化を指標として検討した。

B. 方法

(1) cAMP assay

オピオイド受容体 μ 、 δ 、 κ 各サブタイプおよびムスカリン受容体 m2、m4 各サブタイプのどれか一つを発現させた CHO 細胞を用いた。細胞を 24 穴マルチウェルプレートに 10⁵ 個/well で播種し、各アゴニストで前処置した。薬物を含む培地を吸引除去した後、直ちに洗浄操作を行い、各アンタゴニストをそれぞれ、10 μ M forskolin および 1 mM IBMX と同時に処置し、37°C で 10 分間インキュベーションした。反応は 10% TCA を添加す

ることにより停止し、生成したcAMP量をRIA定量キットを用いて測定した。アゴニストとして μ オピオイド受容体：モルヒネ (Mor)、 δ オピオイド受容体：DPDPE、 κ オピオイド受容体：U69,593、m2 および m4 ムスカリン受容体：carbachol (CCh)、アンタゴニストとして、 μ オピオイド受容体：naloxone (Nlx)、 δ オピオイド受容体：naltrindole (NTI)、 κ オピオイド受容体：norbinaltorphimine (norBNI)、m2 および m4 ムスカリン受容体：atropine (Atr) を用いた。

(2) GTPase 活性の測定

CHO細胞から調製した粗膜標品 (4–8 μ g) を、0.5 μ M [γ - 32 P]GTPを含むHEPES緩衝液中で、各種オピオイドリガンドの存在下あるいは非存在下、37°Cで5分間インキュベーションした。charcoalを添加することにより反応を停止し、遠心後、上清を液体シンチレーションにて測定し、[γ - 32 P]GTPから遊離した 32 Piを定量した。

(3) オピオイド受容体と野生型および各種変異型G蛋白質 α サブユニットを同時に安定的に発現するCHO細胞株の樹立

ラット α_{i2} およびラット α_z cDNAはラット大脳皮質から抽出したtotal RNAを鋳型とし、RT-PCR法により得た。また、マウス α_q cDNAはマウス全脳から抽出したtotal RNAを鋳型とし、RT-PCR法により得た。キメラG蛋白質 α サブユニット α_{i2}/α_q の作製には制限酵素Nsi I認識部位、Sca I認識部位を用いた。 α_{i2} cDNAにはSca I認識部位が、 α_q cDNAにはNsi I認識部位、Sca I認識部位が存在しないため、部位特異的 point変異導入によりそれぞれ導入した。Sca I認識部位導入のため、アミノ酸配列の変化が生じたため、キメラ α サブユニット作製後、野生型 α サブユニットの対応する部位のアミノ酸配列と同じになるように再び point変異導入を行った。各G蛋白質 α サブユニットcDNAを適当な制限酵素で切断し、そのフラグ

メントを発現ベクターpTracer-CMVに組み込んだ。得られた変異型G蛋白質 α サブユニットcDNAを含むプラスミドをlipofectin法により、すでにオピオイド受容体を安定的に発現しているCHO細胞にトランスフェクトし、Zeocin (200 μ g/ml) 存在下で細胞を選別した後、Western blotにより細胞を選別した。

(4) Western blotting

CHO細胞から調製した膜標品 (50 μ g) を、SDS-PAGE (12% アクリルアミド) で分離後、ニトロセルロースメンブランに転写し、Fig. 5に示す部位を抗原とする抗体 (anti- α_{i2} 、anti- α_q あるいは anti- α_z) を用いて、免疫染色を行った。

C. 結果

(1) クローン化オピオイド受容体発現細胞におけるアゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性の形成

μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体、いずれの受容体を発現させたCHO細胞 (μ -OPR/CHO、 δ -OPR/CHO、 κ -OPR/CHO)²⁾ においても、アゴニスト持続的処置を施していない細胞 (naive細胞) では、アゴニストの急性処置により、forskolin誘発cAMP蓄積は抑制されたが、アンタゴニスト単独処置によっては変化しなかった。一方、アゴニストを持続的に処置した細胞 (dependent細胞) では、アンタゴニストの処置により、forskolin誘発cAMP蓄積は、naive細胞においてアンタゴニストを処置した場合と比較して、約2倍にまで促進された (Fig. 1a, b, Fig. 8a)。このアゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性は、比較的短時間 (数分~数時間) のうちに (Fig. 2)、持続的処置するアゴニストの濃度に依存して形成された。また、百日咳毒素を前処置することにより、アゴニスト急性処置による forskolin 誘発 cAMP 蓄積の抑制、およびアゴニスト持続的処置による AC 系の過感受性形成は完全に阻害された (Fig. 8a)。

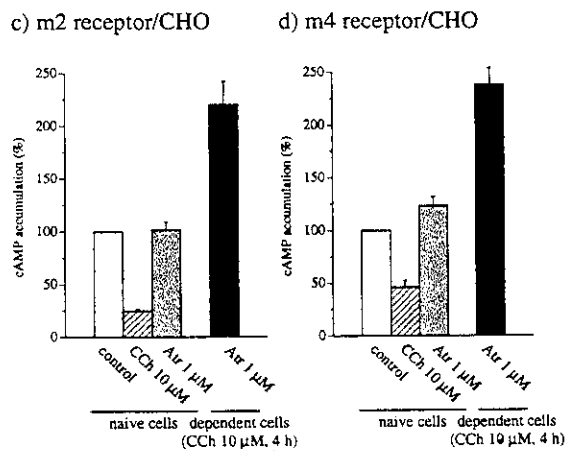
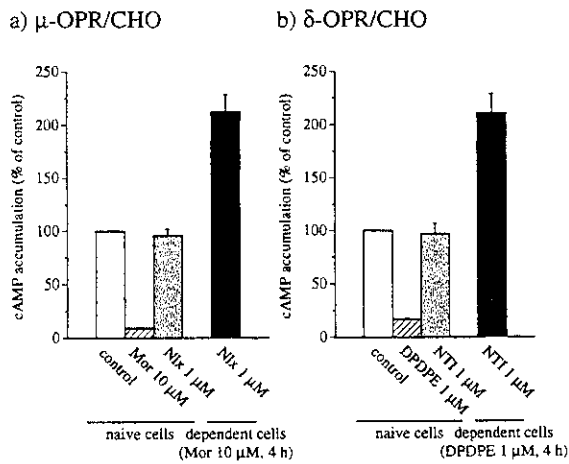


Fig.1 クローン化オピオイドおよびムスカリン受容体を発現するCHO細胞におけるアゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性 ($n=3-5$)

(2) ムスカリン受容体を発現させたCHO細胞におけるAC系の過感受性の形成

オピオイド受容体と同様に、 G_i 蛋白質と共役しACを抑制することが知られているムスカリン受容体m2およびm4サブタイプにおいても、アゴニスト (carbachol) の持続的処置によりAC系の過感受性が形成された (Fig.1c, d)。

(3) AC系の過感受性形成に対する蛋白質合成阻害薬 cycloheximide の効果

アゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性形成に、新たな蛋白質の合成が関与しているか否かを検討するために、蛋白質合成阻害薬 cy-

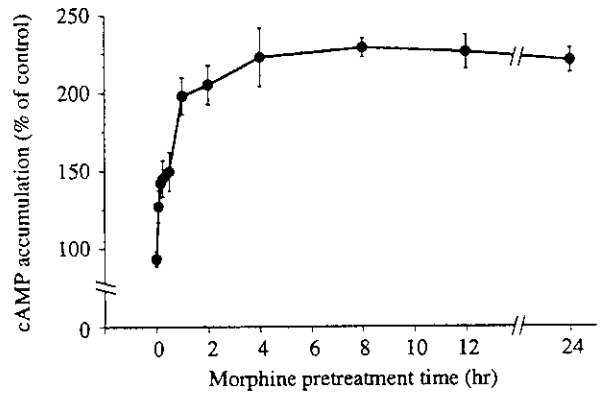


Fig.2 クローン化オピオイド受容体 (μ) を発現するCHO細胞におけるアゴニスト (モルヒネ $10 \mu\text{M}$) 持続的処置によるAC系の過感受性の時間経過 ($n=3$)

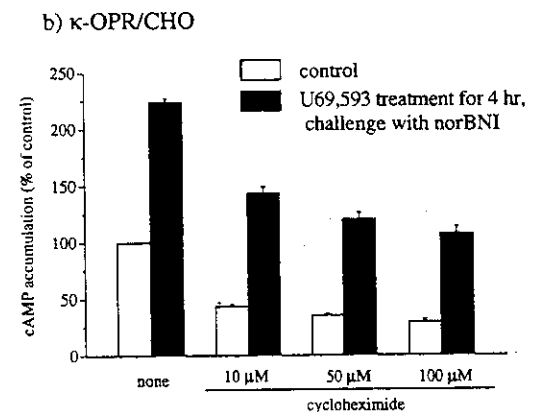
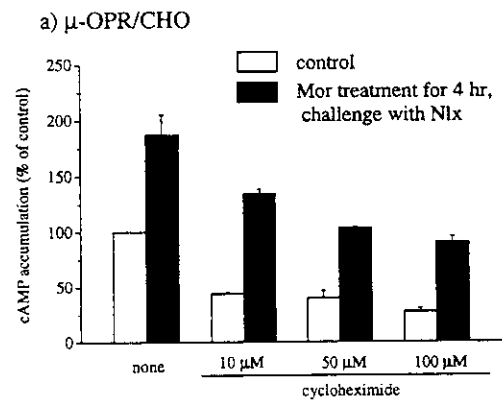
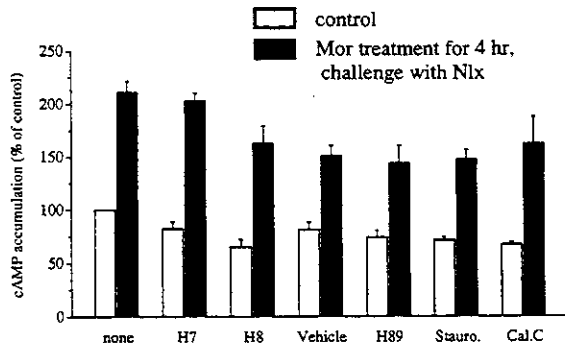


Fig.3 アゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性形成に対する蛋白質合成阻害薬cycloheximideの効果。cycloheximide ($10, 50, 100 \mu\text{M}$) は前処置1時間、アゴニストとともに4時間、計5時間処置した ($n=3$)。

cycloheximideを前処置したが、過感受性の形成に影響は見られなかった (Fig.3)。すなわち、その形成に新たな蛋白質の合成は関与せず、細胞内

a) μ -OPR/CHO



b) κ -OPR/CHO

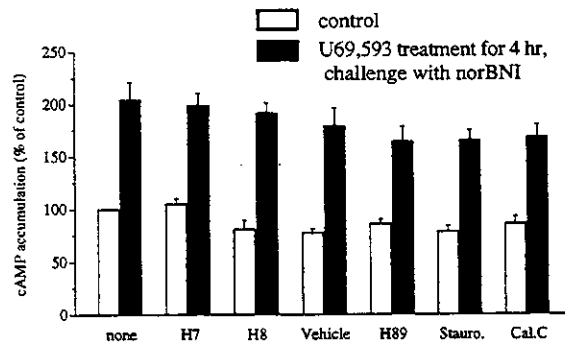


Fig.4 アゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性形成に対する各種プロテインキナーゼ阻害薬の効果。H7 (100 μ M)、H8 (100 μ M)、H89 (10 μ M)、sutaurosporine (Stauro, 0.1 μ M)、calphostin C (Cal.C, 0.1 μ M)、は前処置1時間、アゴニストとともに4時間、計5時間処置した ($n=4$)。

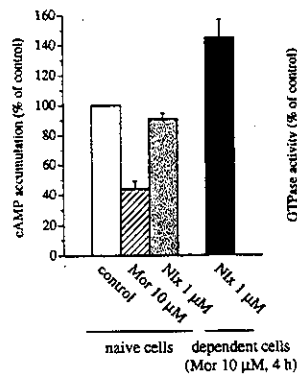
情報伝達調節系の機能的な変化が重要な役割を果たしていることが考えられる。

(4) AC系の過感受性形成に対する各種プロテインキナーゼ阻害薬の効果

過感受性形成に対するリン酸化の関与を検討するため、各種プロテインキナーゼ阻害薬 (H7 100 μ M、H8 100 μ M、H89 10 μ M、staurosporine 0.1 μ M、calphostin C 0.1 μ M) を前処置したが、過感受性の形成に影響は見られなかった (Fig.4)。

(5) AC系の過感受性形成時におけるGTPase活性の変化

a) cAMP assay



b) GTPase assay

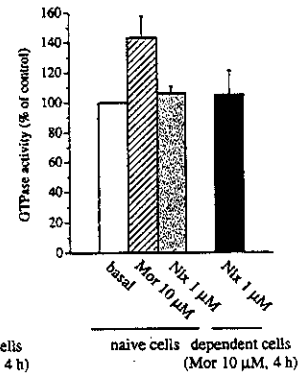


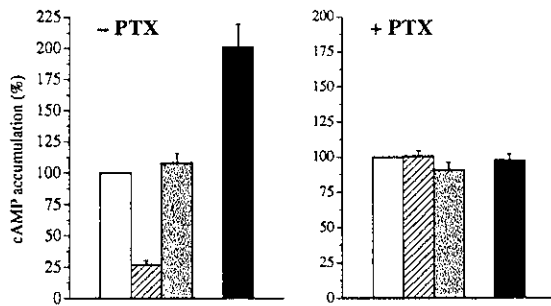
Fig.5 AC系の過感受性形成時におけるGTPase活性の変化。無処置およびモルヒネ (10 μ M) を4時間前処置した μ -OPR/CHOから調製した膜標品において、cAMP assay (a) およびGTPase assay (b) を行なった ($n=5$)。

次に、受容体-G蛋白質連関における変化をGTPase活性を指標として検討した。naive細胞から調製した膜標品において、アゴニストを急性処置することにより、GTPase活性は上昇したが、アンタゴニスト単独の処置はGTPase活性に変化を与えなかった。一方、dependent細胞から調製した膜標品において、アンタゴニストを処置したが、GTPase活性に変化は見られなかった (Fig.5)。

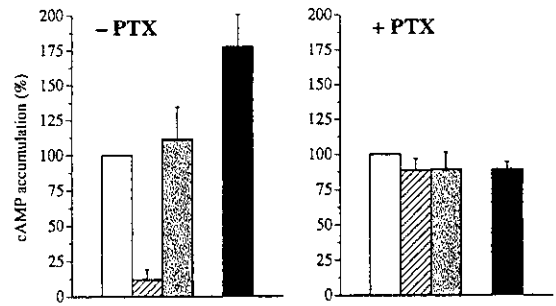
(6) オピオイド受容体と各種キメラG蛋白質 α サブユニット α_{i2}/α_q を共発現させたCHO細胞におけるAC系の過感受性形成

G蛋白質-AC連関が過感受性の形成に必要であるのかどうかを明らかにするため、オピオイド受容体と連関し、ACを抑制することが知られているG蛋白質 α サブユニット α_{i2} と、オピオイド受容体とは連関せず、またACには影響を及ぼさない α_q とのキメラ α サブユニット (Fig. 6) を用いた検討を行った⁴⁾。野生型 α_{i2} 、 α_{i2} の352番目のアミノ酸であるシステインをグリシンに置換した百日咳毒素非感受性の変異型 α_{i2} C352G⁹⁾あるいは種々の百日咳毒素非感受性キメラ α サブユニット (GQI Nsi I、GQI (Sca I)、GIQI) と

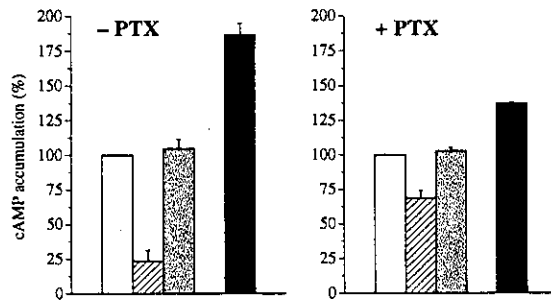
a) κ -OPR/CHO



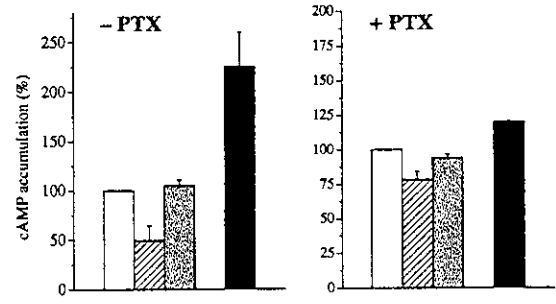
b) κ -OPR + wild-type α_2 /CHO



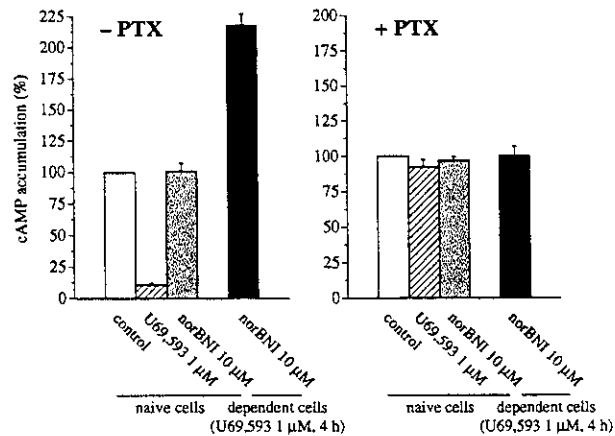
c) κ -OPR + α_2 C352G/CHO



d) κ -OPR + GQI *Nsi* I/CHO



e) κ -OPR + GQI (*Sca* I)/CHO



f) κ -OPR + GIQI/CHO

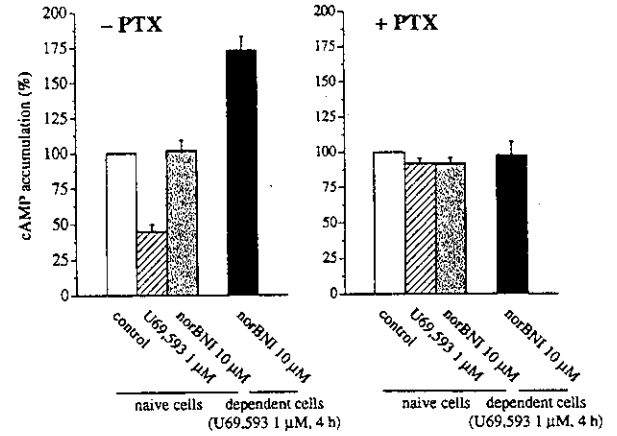


Fig.8 κ オピオイド受容体と野生型あるいは変異型Gタンパク α サブユニットを共発現させたCHO細胞における、アゴニスト持続的処置によるAC系への影響。CHO細胞に内因性に存在するG_iの効果を除去するために、百日咳毒素 (PTX, 20 ng/ml) を、前処置12時間、アゴニストと共に4時間、計16時間処置した。(n=3-5)

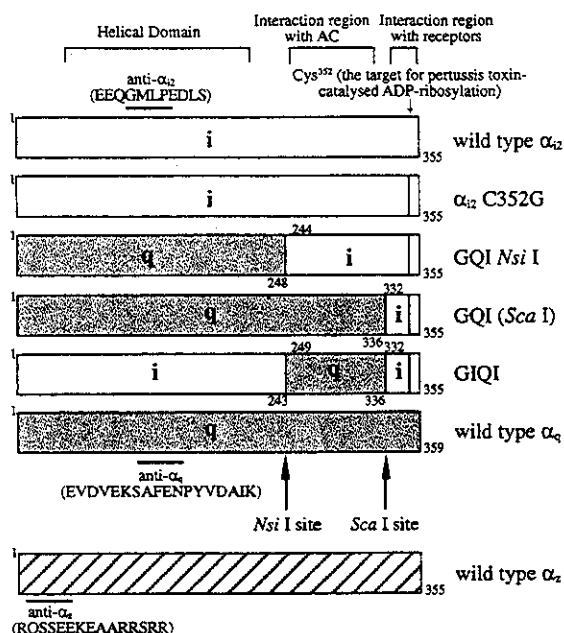


Fig.6 野生型および変異型G蛋白質αサブユニットの作製

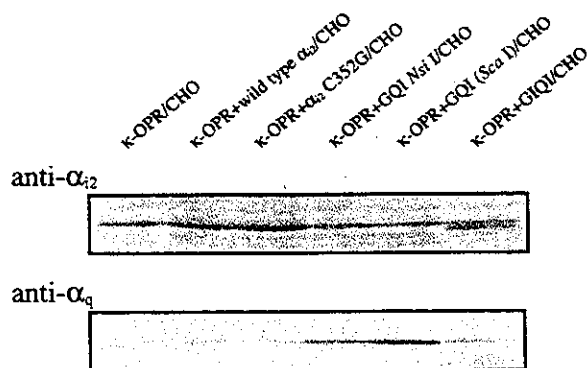


Fig.7 CHO細胞における野生型および各種変異型G蛋白質αサブユニットの発現 (Western blot)

κオピオイド受容体を安定的に発現するCHO細胞株 (κ-OPR+wild type α₂/CHO、κ-OPR+α₂ C352G/CHO、κ-OPR+GQI *Nsi* I/CHO、κ-OPR+GQI (*Sca* I)/CHO、κ-OPR+GIQI/CHO) を樹立し (Fig.7)、さらに、GTPase 活性を指標とした検討より、それらがκオピオイド受容体と機能的に連関していることを確認した (Table 1)。野生型の α₂ を発現させた κ-OPR+wild type α₂/CHO において、百日咳毒素の前処置により、U69,593

Table 1 κオピオイド受容体と野生型および変異型 G 蛋白質αサブユニットを共発現させたCHO細胞における、GTPase 活性に対するアゴニスト刺激の効果

| | U69,593(10 μM)-stimulated GTPase activity (% of control) | |
|-------------------------------------|--|------------|
| | -PTX | +PTX |
| κ-OPR/CHO | 121.1±3.95 | 98.8±2.88 |
| κ-OPR+wild type α ₂ /CHO | 122.7±5.80 | 94.9±3.94 |
| κ-OPR+α ₂ C352G/CHO | 133.8±5.29 | 132.5±5.55 |
| κ-OPR+GQI <i>Nsi</i> I/CHO | 122.9±5.68 | 121.6±8.69 |
| κ-OPR+GQI (<i>Sca</i> I)/CHO | 127.8±8.02 | 123.4±7.48 |
| κ-OPR+GIQI/CHO | 125.9±5.47 | 123.2±6.43 |

急性処置によるACの抑制効果およびU69,593持続的処置によるAC系の過感受性形成は完全に消失した。一方、百日咳毒素非感受性の α₂ を発現させた κ-OPR+α₂ C352G/CHO、または、受容体およびACとの連関領域が α₂ 由来のキメラαサブユニットを発現させたκ-OPR +GQI *Nsi* I/CHOでは、百日咳毒素を前処置してもU69,593の急性処置によりACは抑制され、また、U69,593持続的処置によりAC系の過感受性が形成された。一方、受容体連関領域が α₂ 由来であるが、ACとの連関領域が α_q 由来のキメラαサブユニットを発現させた κ-OPR+GQI (*Sca* I)/CHO および κ-OPR+GIQI/CHO では百日咳毒素前処置下ではU69,593急性処置によるACの抑制効果が見られなくなり、また、U69,593を持続的処置してもAC系の過感受性は形成されなかった (Fig. 8)。

(7) オピオイド受容体と百日咳毒素非感受性G蛋白質αサブユニットα_zを共発現させたCHO細胞におけるAC系の過感受性形成

オピオイド受容体と百日咳毒素非感受性G蛋白質αサブユニットα_z^{3, 10}を共発現させたCHO細胞 (μ-OPR +α_z/CHO および κ-OPR +α_z/CHO) を作製した (Fig.9)。これらの細胞においては、百日咳毒素を前処置してもアゴニスト急性処置

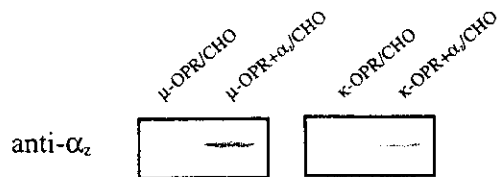


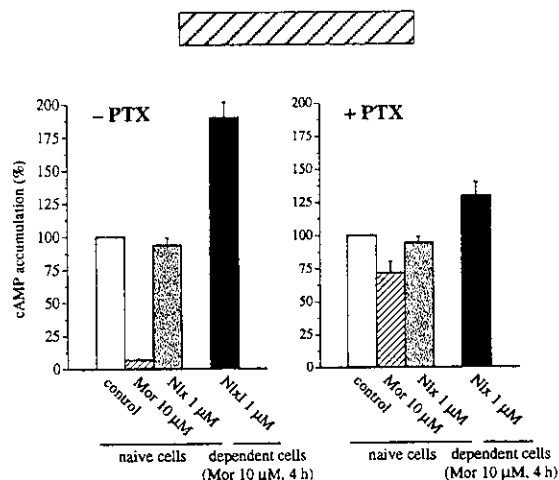
Fig.9 CHO細胞における α_2 の発現 (Western blot)

によるACの抑制効果、およびアゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性形成が見られた (Fig. 10)。

D. 考察

本研究では、麻薬性鎮痛薬による依存形成機構を分子レベルで解明するため、クローン化オピオイド受容体を安定的に発現するCHO細胞を用いて、in vitro系での依存形成のモデルと考えられているアゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性の形成メカニズムについて検討した⁸⁾。AC系の過感受性の形成は、オピオイド受容体のサブタイプにかかわらず、比較的短時間(数分~数時間)のうちに形成され、アゴニスト持続的処置時の百日咳毒素感受性G蛋白質の活性化が必要であることが示された。また、オピオイド受容体と同様にGi蛋白質に共役しACを抑制することが知られているムスカリン受容体m2およびm4サブタイプにおいても、アゴニストの持続的処置によりAC系の過感受性が形成されたことより、この現象がGi共役型受容体に共通のものであることが考えられる。また、蛋白質合成阻害薬cycloheximideを用いた検討から、AC系の過感受性の形成には新たな蛋白質の合成は関与せず、細胞内情報伝達調節系の機能的な変化が重要な役割を果たしていることが示された。アゴニストを持続的処置した際、多くの受容体において脱感作現象が生じることが知られているが、そのメカニズムの一つにPKAあるいはPKCによる受容体のリン酸化が深く関与していることが明らかにされている¹⁾。しかしながら、AC系の過

a) μ -OPR+ α_2 /CHO



b) κ -OPR+ α_2 /CHO

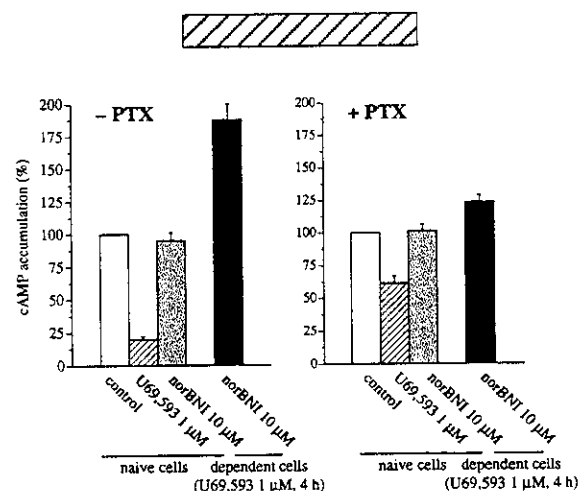


Fig.10 オピオイド受容体(μ および κ)と α_2 を共発現させたCHO細胞における、アゴニスト持続的処置によるAC系への影響。(n=3-5)

感受性形成に対して、各種プロテインキナーゼ阻害薬は影響を与えなかったことから、少なくとも受容体レベルでのPKAあるいはPKCによるリン酸化は関与せず、この現象が脱感作現象とは異なったメカニズムを介するものであることが考えられる。そこで、受容体以降の情報伝達調節系の変化が重要な役割を果たしていると考え、まず、受容体-G蛋白質連関における変化をGTPase活性を指標として検討した結果、過感受性形成時にGTPase活性の変化は見られず、この

ACの過活性化がG蛋白質自身の活性化(GTPase活性上昇)を伴わずに生じていることが示された。さらに、オピオイド受容体と各種キメラ α_{i2}/α_q^4)を共発現させたCHO細胞を用いることにより、過感受性の形成には α_{i2} のACとの連関に参与する領域(Met²⁴⁴-Asn³³¹)が深く関与していることが明らかにされた。一方、オピオイド受容体などのG_i共役型受容体は多くの場合、百日咳毒素非感受性G蛋白質G_zとも連関し、ACの活性を抑制することができることが報告されている^{3,10})。本研究では、AC系の過感受性形成が、百日咳毒素非感受性G蛋白質 α サブユニット α_z を介しても形成されることを明らかにした。すなわちこのことは、 α_i に限らず、ACを抑制することが可能なG蛋白質 α サブユニットが、連関している受容体の連続的な刺激に対応してACの活性を持続的に抑制することが重要な役割を果たしていることを示唆している。これらの研究結果は、オピオイド受容体などのG_i共役型受容体においてアゴニスト持続的刺激により形成されるAC系の過感受性は、受容体あるいはGタンパク質そのものが持続的に活性化されることよりも、むしろG蛋白質 α サブユニットがACを持続的に抑制することが重要であることを示唆している。

E. 結論

クローン化オピオイド受容体発現細胞を用い、アゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性形成の分子メカニズムを解析したところ、その形成に新たな蛋白質の合成は関与せず、細胞内情報伝達調節系の機能的な変化が重要な役割を果たしていること、リン酸化の関与は少ないと考えられること、また、受容体あるいはGタンパク質そのものが持続的に活性化されることよりも、むしろG蛋白質 α サブユニットがACを持続的に抑制することが重要であることが示唆された。

F. 文献

- 1) Chuang, T.T., Lacovelli, L., Sallèse, M. *et al.*: G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17, 416-421, 1996.
- 2) Katsumata, S., Minami, M., Nakagawa, T. *et al.*: Pharmacological study of dihydroetorphine in cloned μ -, δ - and κ -opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 291, 367-373, 1995.
- 3) Lai, H.W.L., Minami, M., Satoh, M. *et al.*: G_z coupling to the rat κ -opioid receptor. *FEBS Lett.*, 360, 97-99, 1995.
- 4) Medina, R., Grishina, G., Meloni, E.G. *et al.*: Localization of the effector-specifying regions of G_{i2} α and G_q α . *J. Biol. Chem.*, 271, 24720-24727, 1996.
- 5) Minami, M. and Satoh, M.: Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.*, 23, 121-145, 1995.
- 6) Nestler, E.J., Hope, B.T. and Widnell, K.L.: Drug addiction: A model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron*, 11, 995-1006, 1993.
- 7) Sharma, S.K., Klee, W.A. and Nirenberg, M.: Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3092-3096, 1975.
- 8) Thomas, J.M. and Hoffman, B.B.: Adenylate cyclase supersensitivity: a general means of cellular adaptation to inhibitory agonists? *Trends Pharmacol. Sci.*, 8, 308-311, 1987.
- 9) Wise, A., Watson-Koken, M.-A., Rees, S., *et al.*: Interactions of the α_{2a} -adrenoceptor with multiple G_i-family G-proteins: studies with pertussis toxin-resistant G-protein mutants. *Biochem. J.*, 321, 721-728, 1997.
- 10) Wong, A., Conklin, B.R. and Bourne, H.R.: G_z-mediated hormonal inhibition of cyclic AMP accumulation. *Science*, 255, 339-342, 1992.

トランスジェニック動物を用いた薬物依存発現機序の検討

鍋島俊隆 名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部
野田幸裕 名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部
間宮隆吉 名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部
宮本嘉明 名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部

【研究要旨】薬物依存の形成機序を行動薬理的に解析するため、脳内カテコールアミン合成系および細胞内情報伝達系の遺伝子を改変させたマウスにおいて薬物依存が形成されるかどうかを調べた。Morphine を連続投与した野生型マウスに naloxone を投与すると、退薬症状が顕著に発現した。しかし、tyrosine 水酸化酵素 (TH) および cyclic AMP response element binding protein (CREB) 結合タンパク (CBP) 遺伝子変異マウス、あるいは phosphodiesterase IV 阻害薬の rolipram と morphine を 5 日間併用投与したマウスでは naloxone 誘発退薬症状の発現回数が減少した。Phencyclidine (PCP) 連続投与野生型マウスにおいて、PCP は place preference を惹起したが、TH および CBP 遺伝子変異マウス、あるいは rolipram と PCP を 28 日間併用投与したマウスにおいては、PCP 誘発 place preference は観察されなかった。以上の結果から、依存形成過程には、脳内カテコールアミンおよび cyclic AMP が関与する情報伝達系が重要な役割を果たしていることが示唆される。

A. 目的

中枢神経作用薬である morphine, amphetamine や phencyclidine (PCP) をヒトや動物に連用すると依存が形成される^{1,2,3)}。薬物依存には、薬物の精神薬理作用による精神依存と退薬による不快な生体反応を示す身体依存（退薬症状の発現）がある³⁾。薬物依存の研究は、行動薬理学に始まり、神経伝達物質の神経化学、その作用部位となる受容体の発見、それらの遺伝子のクローニングやノックアウト等の分子生物学的手法の導入によって飛躍的に進歩してきた。これらの研究から薬物依存の形成機序にはかなり共通した神経系や情報伝達系が関与していることが示唆されている⁶⁾。すなわち、薬物の強化効果や報酬効果および morphine による身体依存に脳内カテコール

アミンや cyclic AMP (cAMP) 系が関与していることが報告されている^{5,6)}。しかし、これらの報告の多くは、培養細胞や摘出標本などを用いた実験によって依存形成機序の解明を行っており¹⁰⁾、このような in vitro の系で得られた結果がどの程度行動薬理的に反映されるかはまだ明らかでない。

そこで、依存形成機序を行動薬理的に解析するため、脳内カテコールアミン合成系および細胞内情報伝達系の遺伝子を改変させたマウスにおいて薬物依存が形成されるかどうかを調べた。

B. 方法

B-1. 使用動物

本実験には、奈良先端科学技術大学院大学・遺伝子教育研究センター動物分子工学

の小林和人助教授ならびに藤田保健衛生大学・総合医科学研究所の永津俊治教授により作製された tyrosine 水酸化酵素 (TH) 遺伝子変異マウス^{4,7)}、熊本大学医学部・附属遺伝発生医学研究施設 発生遺伝部門の山村研一教授により作製された cAMP response element binding protein (CREB) 結合タンパク (CBP) 遺伝子変異マウス⁹⁾および Std-ddY 系マウス (日本 SLC) を使用した。

TH 遺伝子変異マウスの脳内 TH 活性は、約 40 % まで減少していた⁴⁾。

これらのマウスは、恒温恒湿条件下 (室温 24 ± 1 °C, 湿度 55 ± 5 %) で飼育し、実験室に 1 時間以上馴化した後、実験に使用した。

B-2. 薬物

Phencyclidine (PCP) は、名城大学薬学部古川宏教授に合成して頂き、rolipram は、明治製菓 (株) より頂いた。PCP, morphine HCl (塩野義製薬) および naloxone HCl (Sigma) は生理食塩水に、rolipram は、2% DMSO で溶解した。

B-3. Morphine 連続投与マウスにおける naloxone 誘発退薬症状

Morphine (10 mg/kg s.c.) を 1 日 2 回、5 日間マウスに連続投与した。6 日目には morphine 連続投与マウスに morphine (10 mg/kg s.c.) を投与し、投与 2 時間後に naloxone (5 mg/kg i.p.) を投与した。Naloxone 投与直後から退薬症状 (逃避跳躍行動, 前肢振戦および立ち上がり行動) の発現回数を 15 分間記録した。

Rolipram は、morphine (10 mg/kg/day) 投与 30 分前に 5 日間連続併用投与した。

B-4. Conditioned place preference (CPP) 法⁸⁾

CPP 法の装置は、実験者が任意にギロチンドアで仕切ることのできる黒色の部屋および床面に白色の網を敷いた透明の部屋からなるアクリル製のものを使用した⁸⁾。

PCP (10 mg/kg s.c.) を 1 日 1 回、28 日間マウスに連続投与し、翌日から CPP 試験を行った。

Pre-conditioning は 3 日間行い、装置内のギロチンドアを開けた状態で、マウスを装置に入れ 900 秒間自由に探索させた。Pre-conditioning の 3 日目に、各部屋に滞在した時間を測定し、長く滞在した部屋を preferred side, 逆の部屋を non-preferred side とした。

Conditioning は、6 日間に渡り行い、1, 3, 5 日目には PCP (8 mg/kg) を皮下投与した直後にギロチンドアを閉め non-preferred side に、2, 4, 6 日目には saline を皮下投与した直後にギロチンドアを閉め preferred side にそれぞれ 20 分間マウスを閉じ込めた。

Post-conditioning は、Conditioning 終了の翌日に行い、マウスをギロチンドアを開けた装置内に入れ 900 秒間自由に探索させ、Pre-conditioning の 3 日目と同様に各部屋に滞在した時間を測定した。

Pre-conditioning および Post-conditioning おいてマウスが各部屋に滞在している時間は、東洋産業株式会社の SCANET SV-10 LD を用いて測定した。

薬効評価は、Pre-conditioning および Post-conditioning において non-preferred side に滞在した時間から preferred side に滞在した時間を引いた値をそれぞれ Pre value および Post value とし、さらに、Post value から Pre value を引いた値を Post-Pre value として評価した。

Rolipram は, PCP (10 mg/kg/day) 投与 30 分前に28 日間連続併用投与した。

B-5. 統計処理

結果は, すべて平均 ± 標準誤差で表した。得られたデータの統計解析を行い, $P < 0.05$ であるものを有意であるとした。

C. 結果

C-1. Morphine 誘発身体依存

Morphine を連続投与した野生型マウスに naloxone を投与すると, 投与直後より逃避跳躍行動, 前肢振戦および立ち上がり行動が顕著に発現した。一方, TH 遺伝子変異マウスおよび CBP 遺伝子変異マウスでは naloxone 誘発逃避跳躍行動, 前肢振戦の発現回数が, 野生種と比較して有意に減少した (Figs. 1 and 2)。

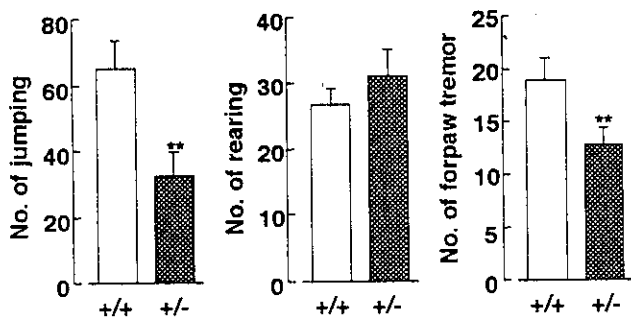


Fig. 1 Naloxone-induced precipitated morphine withdrawal syndrome in TH ^{+/+} mice pretreated with morphine. +/+; wild-type mice, +/-; mutant mice. ** $P < 0.01$ vs wild-type.

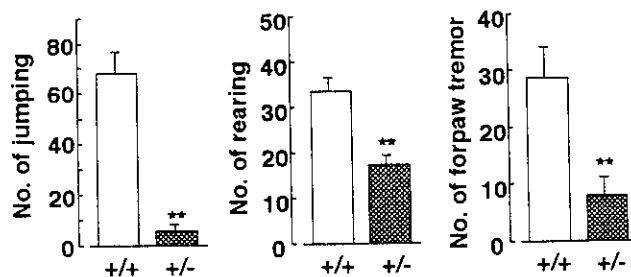


Fig. 2 Naloxone-induced precipitated morphine withdrawal syndrome in CBP ^{+/+} mice pretreated with morphine. +/+; wild-type mice, +/-; mutant mice. ** $P < 0.01$ vs wild-type.

C-2. PCP 誘発 place preference

PCP 連続投与野生型マウスにおいて, PCP は place preference を惹起したが, TH 遺伝子変異マウスおよび CBP 遺伝子変異マウスにおいては, PCP 誘発 place preference は観察されなかった (Figs. 3 and 4).

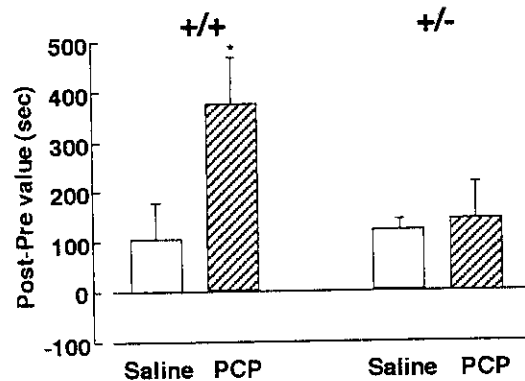


Fig. 3 PCP-induced place preference in TH ^{+/+} mice pretreated with PCP. +/+; wild-type mice, +/-; mutant mice. * $P < 0.05$ vs corresponding saline-treated group.

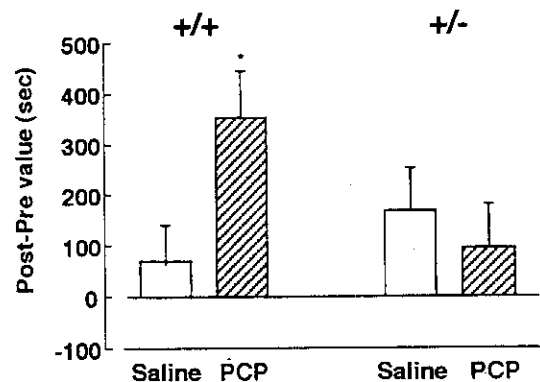


Fig. 4 PCP-induced place preference in CBP ^{+/+} mice pretreated with PCP. +/+; wild-type mice, +/-; mutant mice. * $P < 0.05$ vs corresponding saline-treated group.

C-3. Phosphodiesterase IV 阻害薬の効果

a) Morphine 誘発身体依存

Phosphodiesterase IV 阻害薬の rolipram (1 mg/kg i.p.) と morphine を 5 日間併用投

与したddY系マウスに、naloxoneを投与しても、逃避跳躍行動、前肢振戦は観察されなかった (Fig. 5).

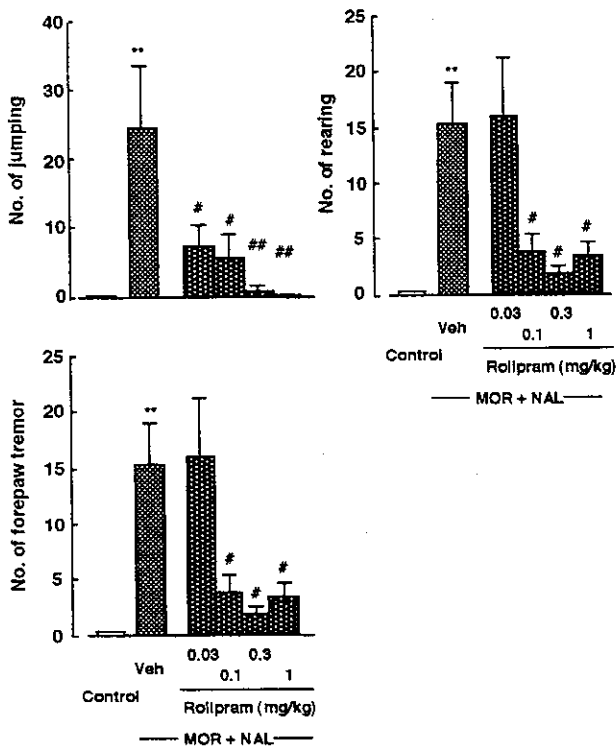


Fig. 5 Effects of rolipram treatment during development of morphine dependence on naloxone-precipitated withdrawal syndrome in mice. Veh: vehicle, MOR: morphine, NAL: naloxone. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs (MOR + NAL)-treated group.

b) PCP 誘発 place preference

Rolipram (1 mg/kg i.p.) とPCPを28日間併用投与したddY系マウスにおいて、PCPはplace preferenceを発現しなかった (Fig. 6).

D. 考 察

近年、分子生物学の発展により、分子生物学的手法を用いて、in vitro の系で薬物依存の形成および発現メカニズムの解明がなされている。しかし、これらの実験系で

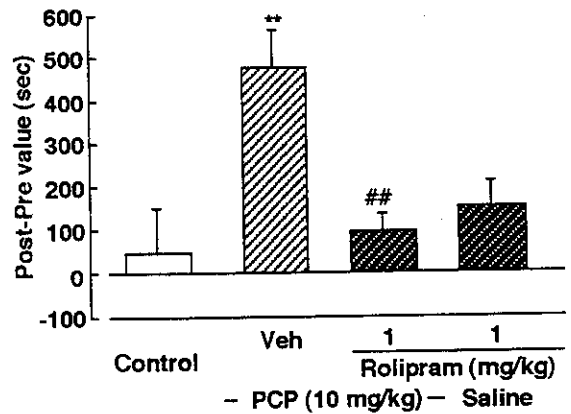


Fig. 6 Effect of rolipram treatment during development of PCP dependence on PCP-Induced place preference in mice. Veh: vehicle. ** $P < 0.01$ vs control, ## $P < 0.01$ vs (vehicle + PCP)-treated group.

得られた結果が実際にどの程度行動薬理的に反映されるかについては明らかでない。そこで、脳内カテコールアミンの合成能を遺伝的に障害したTH遺伝子変異マウスおよび細胞内のcAMP, CREB, CREを介する反応の遺伝子転写を障害するためにCBP遺伝子変異マウスを用いて薬物依存が形成されるかどうかを調べた。その結果、両遺伝子変異マウスにおいてmorphine誘発身体依存およびPCP誘発精神依存は形成されなかった。これまでの報告と今回の結果から、両薬物による依存形成には以下の仮説が考えられる。すなわち、morphineあるいはPCPを連続投与すると脳内カテコールアミン作動性神経系の機能が亢進され、adenylate cyclase (AC) とカップリングしている受容体を介してcAMPの産生が促進される。産生されたcAMPはcAMP-dependent protein kinaseを活性化し、CREBはリン酸化され、coactivatorのCBPが結合し、CREBは活性型となる。さらにリン酸化されたCREBはCREに結合し、標的となる遺伝子の転写を促進する。しかし、先天的に脳内カテコー

ルアミン作動性神経系やCBPの活性が低下している遺伝子変異マウスでは、これらの情報伝達系が障害されているので、依存が形成されなかったものと推察される。したがって依存形成過程には、脳内カテコールアミンおよびcAMPが関与する情報伝達系が重要な役割を果たしていることが示唆される。

一方、オピオイド受容体を有する培養細胞の培液中にmorphineを添加すると、細胞のAC活性が抑制されるが、持続的にmorphineを添加すると、代償的にAC活性は上昇する¹⁰⁾。今回の実験においてphosphodiesterase IV阻害薬のrolipramの連続併用投与によってmorphineおよびPCPに対する依存形成が抑制されたことは、rolipramがmorphineおよびPCPによるAC活性の低下を抑制した結果、連続投与後にAC活性が代償的に上昇するのを抑制したことによるものと思われる。しかし、PCPがどのようにAC活性に影響を与えるかは、今後さらに検討する必要がある。

以上のように、我々は、これまでに分子生物学的手法によりin vitroで解明された薬物依存の形成機序を行動薬理学的に調べた。今後、種々の遺伝子変異マウスを用い、行動薬理学的、神経化学的あるいは分子生物学的に薬物依存の形成および発現メカニズムを解明し、種々の薬物依存に共通する因子を探索していく予定である。

E. 結 論

本研究において、morphineおよびPCP誘発依存形成過程には、脳内カテコールアミンおよびcAMPが関与する情報伝達系が重要な役割を果たしていることが見出された。

[参考文献]

- 1) Bickel W.K., DeGrandpre R.J. and Higgins S.T.: The behavioral economics of concurrent drug reinforcers: a review and reanalysis of drug self-administration research. *Psychopharmacology*, 118: 250-259, 1995.
- 2) Carroll M.E.: PCP and hallucinogens. *Advances in Alcohol and Substance Abuse*, 9: 167-190, 1990.
- 3) Collier H.O.J.: Cellular site of opiate dependence. *Nature*, 283: 625-629, 1980.
- 4) Kobayashi K., Sasaoka T., Morita S., Nagatsu I., Iguchi A., Kurosawa Y., Fujita K., Nomura T., Kimura M., Katsuki M. and Nagatsu T.: Functional and high level expression of human dopamine β -hydroxylase in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1631-1635, 1998.
- 5) Kuriyama K., Nakagawa K., Naito K. and Muramatsu M.: Morphine-induced changes in cyclic AMP metabolism and protein kinase activity in the brain. *Jpn. J. Pharmacol.*, 28: 73-84, 1978.
- 6) Nestler E.J.: Cellular responses to chronic treatment with drugs of abuse. *Critical Rev. in Neurobiol.*, 7: 23-39, 1993.
- 7) Nishii K., Matsusita N., Sawada H., Sano H., Noda Y., Mamiya T., Nabeshima T., Nagatsu I., Hara T., Kikuchi K., Yoshizato H., Nakashima K., Nagatsu T. and Kobayashi K.: Motor and learning dysfunction during postnatal development in mice defective in dopamine neuronal transmission. *J. Neurosci. Res.*, 54:

450-464, 1998.

- 8) Noda Y., Miyamoto Y., Mamiya T., Kamei H., Furukawa H. and Nabeshima T.: Involvement of dopaminergic system in phencyclidine-induced place preference in mice pretreated with phencyclidine repeatedly. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 286: 44-51, 1998.
- 9) Oike Y., Hata A., Mamiya T., Kaname T., Noda Y., Suzuki M., Yasue H., Nabeshima T., Araki K. and Yamamura K.: Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: Implication of a dominant negative mechanism. *Human Mol. Genet.*, in press, 1998.
- 10) Sharma S.K., Klee W.A. and Nirenberg M.: Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 3092-3096, 1975.

モルヒネ依存形成に関わる遺伝子発現の研究 —モルヒネおよびナロキソンによるカルモジュリンおよびニューロフィラメント遺伝子発現の変化—

分担研究者 三木直正 大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学
共同研究者 郭 哲輝 大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学
牛 三勇 大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学

【研究要旨】

慢性モルヒネ投与により脳内 Pur α の DNA への結合活性が低下することをすでに見出している。Pur α は、(GGN) n のくり返し配列を認識する一本鎖 DNA 結合蛋白質であり、多くの遺伝子のプロモータ領域に存在し、複製や転写に関係していると考えられている。Pur α の DNA 結合には、内因性活性化因子が必要であることを見出し、かつ、これが慢性モルヒネ投与により影響を受けると推定している。この内因性活性化因子を精製したところ、カルモジュリン (calmodulin, CaM) であることが明らかとなった。このことより Ca/CaM \rightarrow Pur α を介する新しい遺伝子発現経路の存在が示唆され、この系がモルヒネによる依存形成に関係している可能性がある。一方、慢性モルヒネにより腹側被蓋野のニューロフィラメント量が低下することが知られているので、ニューロフィラメントプロモータ領域を SK-N-SH 細胞に導入し、モルヒネおよびナロキソンによるプロモータ活性への影響を調べたところ、モルヒネではなく、ナロキソンによりプロモータ活性が抑制された。ナロキソン自体に遺伝子発現を抑制する作用があることを見出した。

A. 研究目的

モルヒネの反復投与により依存・耐性が生じることが知られているが、そのメカニズムは不明である。依存・耐性形成には、連続した薬物の投与が必要であることから、脳内の遺伝子発現が関わっている可能性は古くから示唆されている。近年、様々なプロモータ上のエレメントを特異的に認識するに多くの転写因子が遺伝子発現調節をしていることが明らかにされている。従来、モルヒネは G 蛋白質の Gi を介してアデニレ

ートサイクラーゼ活性を抑制することが知られている。細胞内 cAMP 情報は核内の CREB (cAMP response element binding protein) に伝わり、遺伝子発現を調節していることが知られている。このことから、モルヒネの依存・耐性形成は cAMP \rightarrow CREB 系が関係しているとの報告がある (3)。しかし、我々は Pur α の DNA への結合が慢性モルヒネ投与により減少すること、これには内因性活性化因子が関係していることをすでに報告している (1, 6, 7, 8)。

今回は、この因子の精製を試みた(4)。一方、慢性モルヒネ投与により腹側被蓋野のニューロフィラメント量が減少することが知られているので(2)、ニューロフィラメントプロモータをSK-N-SH細胞に導入し、モルヒネやナロキソンがこのプロモータ活性にどのような影響を与えるかについても検討した。

B. 方法

1. 使用薬物

ナロキソン (Naloxone hydrochloride) および Dulbecco's Modified Eagle's Medium は Sigma 社から、pGL3 リポーターベクター、pRL-SV40 ベクター、Luciferase assay system、dual-luciferase assay system および Tfx 試薬は Promega から購入した。

2. ゲルシフトアッセイ

(5'-CTGGGGGCGCCTCCCCTTGGCTGACGTCAGAG-3')をプローブとして、すでに報告した方法で行った。

3. ベクター作製

1.7 Kb の Hind III 末端を持つマウスのニューロフィラメント遺伝子のプロモータを pGL-3 エンハンサーベクターの Hind III 末端に導入してライゲーションした。各種欠損遺伝子は NF68 プロモータの中に存在する KpnI(-993)、NruI(-328)と PstI(-1.25k, -513, -101) 制限酵素サイトと pGL-3 エンハンサーベクターの制限酵素サイト MluI と KpnI を利用して構成した。また、ラット CaM II プロモータの 0.74Kb 断片も pGL3-エンハンサーベクターに挿入

した。

4. 細胞培養と Luciferase アッセイ

細胞は 10%ウシ胎仔血清を含む DMEM 培養液にて培養した。60%の細胞密度になった時点で、DNA のトランスフェクションを行った。1 ml リポフェクチン脂質 Tfx とプラスミドの混合液を培養皿に加えて、1 時間にインキュベートし、さらに 2 ml 培養液を添加して培養した。ナロキソンなど薬物を添加し、48 時間培養した後、細胞をトリプシンで剥離し、溶解液 400 μ l で全細胞蛋白を抽出した。100 μ l luciferase アッセイバッファーに 20 μ l の抽出液を加え、luminometer で dual-luciferase reporter assay system の用い発光強度を測定した。

5. 細胞内カルシウムの測定

カバースライド上で培養した細胞をアセトキシメチルエステル Fura-2 (Fura-2-AM)と 30 分間インキュベートし、Fura-2 を細胞内に取り込ませた。カバースライドは、KCl を含む Hepes 緩衝液で 2 回洗浄した後で、専用チェンバーに固定して、緩衝液で灌流しながら、倒立型の落射蛍光顕微鏡 (オリンパス IMT-2) とフォトマルを用いたスポット測光装置 (オリンパス OSP-3) を用いて、細胞の中に蛍光強度を測定した。[Ca²⁺]_i の上昇は Fura-2-Ca²⁺ 蛍光強度の上昇として測定した。Fura-2 は Ca²⁺ と結合しないときは 380 nm の励起波長で最強の蛍光を発するが、Ca²⁺ と結合すると 340 nm の励起波長で蛍光が最大となる。蛍光量から相対的な Ca²⁺ 量を求めるため、以下の式を用いた。[Ca²⁺]_i の量 = (R-R_{min})/(R_{max}-R)。R : 340 nm の励起波

長で発する蛍光量/380 nm の励起波長で発する蛍光量。 R_{min} :すべての Fura-2 と Ca^{2+} が遊離したときの R 値。 R_{max} :すべての Fura-2 と Ca^{2+} が結合したときの R 値。 KCl を含む Hepes 緩衝液に薬物を添加し、 $[Ca^{2+}]_i$ の影響を測定した。

C. 結果

1、Pur α 活性化因子の精製と同定

マウス全脳の上清分画を、熱処理、イオン交換カラム、DNA アフィニティカラムを用いて、単一バンドにまで精製し、アミノ酸組成を調べたところ、カルモジュリンと同一であることが明らかとなった(表1)。フェニルセファロースカラムからの溶出も、カルモジュリンと同じパターンを示した。市販のカルモジュリンを Pur α に添加することにより、Pur α の DNA 結合活性は増強された。この結果より、Ca/CaM \rightarrow Pur α 経路を介する新しい遺伝子発現系が明らかとなった。

2、モルヒネ投与による CaM 遺伝子の発現調節

Pur α は、(GGN) $_n$ のくり返し配列を認識する。CaM 遺伝子のプロモータ領域には Pur α のコンセンサス配列が存在するので、モルヒネにより、CaM 遺伝子発現が影響されるかどうかを PCR 法で調べた。PC12 細胞において、 $10^{-4}M$ モルヒネ添加により 24-48 時間にかけて、CaM 遺伝子発現が増加した(図1)。また、この増加はモルヒネの濃度依存性であった。

3、ナロキソンによるニューロフィラメン

トプロモータ活性の抑制

ニューロフィラメント (NF) プロモーター luciferase を発現ベクターに組み込み、SK-N-SH 細胞にトランスフェクトした。遺伝子

導入細胞をモルヒネ処理したが、luciferase 活性には変化がみられなかった。しかし、ナロキソンは、濃度依存的に NF プロモータ活性を抑制した。また、NF プロモータ活性の抑制は時間依存性で、時間とともに抑制は増加し、48 時間で約 50% の抑制が見られた。同じベクターを PC12 細胞や N18TG2 細胞に導入したが、ナロキソンおよびモルヒネによる阻害作用は見られなかった。

4、ナロキソン反応エレメントの同定

NF プロモータ領域の種々の欠損遺伝子を作製し、ナロキソンによる阻害活性に関与する領域を決定することを試みた。 -930 まで削除すると、basal 活性が上昇したので、 -1600 から -930 の間に抑制エレメントが存在することが示唆された。ナロキソンによる抑制に関与する領域は、 -100 から $+100$ の領域にあることが考えられた(図2)。

5、ナロキソンによる細胞内 Ca の上昇

SK-N-SH 細胞に Fura-2 を取り込ませ、顕微鏡で、単一細胞のカルシウムの変化を、モルヒネおよびナロキソン添加で調べた。モルヒネでは細胞内 Ca の変化は見られなかったが、ナロキソンにより細胞内 Ca の著明な増加が見られた。しかし、PC12 細胞や N18TG2 細胞では、ナロキソンにより、細胞内 Ca は増加しなかった(図3)。