

【方法】

動物: 実験には生後7~8週の雄性ウイスターラットをアダルトとして用いた。

in situハイブリダイゼーション: DIGラベルしたcRNAをクローン化*mrt1* cDNA断片 (B41-3, 1778bp) よりT7またはT3 RNAポリメラーゼ (プロメガ) を用いて合成し、加水分解処理によって100~500 nt程度にしたものをプローブとして用いた。ハイブリダイゼーションは5×SSPE, 2 mM EDTA, 1×Denhardt's solution, 50 μg/ml tRNA from Baker's yeast, 250 μg/ml sonicated salmon testes DNA, 0.1% Tween-20, 50% formamideにプローブを加えて55℃、16 hr以上行い、ストリンジェントな洗浄は2×SSC, 10mM DTT, 5mM EDTA, 50% formamide中で55℃にて行った。シグナルはアルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体とNBT/BCIP発色系を用いて検出した。

免疫沈降とウェスタンブロットティング: ラット大脳新皮質を4℃のLysisバッファー (50 mM Tris·HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1×Complete (ロッシェ)) 中でダウンスホモジェナイザー (ウィートンサイエンス) を用いて懸濁し、これに等量の2×Detergent (0.25% SDS, 1.25% sodium deoxycholate, 2.5% NP-40, 1×Complete (ロッシェ)) を加えて氷上で30分放置した後、10,000×g, 20 min, 4℃で遠心して得た上清をタンパク質抽出液とした。このタンパク質50 μgをSDS-PAGEで分離後、PVDF膜 (バイオラッド) に転写してウェスタンブロットティングとした。*mrt1*特異的抗体は昨年度得た抗血清 (*mrt1*遺伝子産物のN末端領域のアミノ酸配列に基づくペプチド(4-19)をKLHに共有結合させて抗原とし、ウサギ2羽を免疫して得られた) を抗原ペプチドカラムを用いてアフィニティ精製したものを用いた。この抗*mrt1*ポリクローナル抗体5 μgを上記ラット大脳新皮質抽出タンパク質200 μgと4℃、一晚インキュベートし、組換えプロテインA-FF (ファルマシア) で沈降させた。リン酸化チロシンの検出には抗リン酸化チロシン特異的モノクローナル抗体4G10-HRPコンジュゲート (アップステート・バイオテクノロジー) を用いた。

急性投与実験: SCH23390 (0.5 mg/kg) または

生理食塩水を皮下投与してから30分後にMAP (4.8 mg/kg) または生理食塩水を皮下投与し、1時間後に断頭、neocortexを分取し、凍結保存した。また、MAP (4.8 mg/kg) を皮下投与後、1、3、6、24時間経過後に断頭、neocortexを分取し、凍結保存した。

慢性投与実験: SCH23390 (0.5 mg/kg) または生理食塩水を皮下投与してから30分後にMAP (4.0 mg/kg) または生理食塩水を皮下投与投与することを1日1回、5日間繰り返し、2週間後に断頭、neocortexを分取し、凍結保存した。また、同様の5日間慢性投与を行って2週間後にMAPを1.6 mg/kg皮下投与して行動観察を行い、行動感作形成の有無を判別した。

RT-PCRによる*mrt1*発現量の測定: 凍結サンプルから抽出し、DNaseIで処理した全RNA (0.2 μg) をランダムヘキサマーを用いて反応容量20 μlで一本鎖cDNAに変換し、TEバッファー (10 mM Tris·HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) で10倍に希釈したもの10 μlをPCRテンプレートとした。*mrt1*特異的プライマー (0.5 μM) および28SリボソームRNA (r28S) 特異的プライマー (0.13 μM) を加えたPCR反応液20 μlを94℃ 30 sec、60℃ 30 sec、72℃ 30 secでインキュベーションするサイクルを27回繰り返した。このときr28S特異的プライマーと競合する3'末端リン酸化オリゴヌクレオチドを0.37 μM加え、上記反応条件下で*mrt1*およびr28Sの増幅がいずれも指数関数的に行われるようにした。増幅産物はアガロースゲル電気泳動で分離することによって識別、定量し、*mrt1*増幅産物量をr28S増幅産物量で補正した相対的な発現量として算出した。また、昨年度と同様にcompetitive RT-PCRによっても*mrt1*発現量を測定し、この場合はcDNAコンペティターと競合したコピー数を全RNA 1 μgあたりに換算した値として表した。

【結果】

***mrt1*は主としてニューロンに発現する。**

ノーザンブロットにおいて、*mrt1*が脳の各部位において発現していることを昨年度報告しているが、*in situ*ハイブリダイゼーションにおいても*mrt1*が脳の各部位で広く発現していることが示された。特に、ニューロンと思われる細胞での発現が顕著であった (Fig. 1)。

***mrt1*遺伝子産物はチロシンリン酸化されたPDZタンパク質である。**

cDNA塩基配列より予想される*mrt1*遺伝子産物 (Mrt1) はN末端にGlyに富む領域が存在し、これに続いて1つのPDZドメインを持つ (Fig. 2A)。Y240およびY398はチロシンキナーゼによるリン酸化の可能性が予想されるが、実際に抗Mrt1抗体による免疫沈降物が抗リン酸化チロシン特異的モノクローナル抗体4G10によって認識されることから (Fig. 2B)、ニューロナルPDZタンパク質であるMrt1はチロシン残基リン酸化タンパク質であることが推定された。

MAP急性単回投与による*mrt1*発現増強はドーパミンD1受容体に依存する。

MAPによる行動感作の成立はD1受容体を介したドーパミン神経伝達に依存し、D1受容体に選択的なアンタゴニストであるSCH23390によって阻害される [3]。MAP投与1時間後の*mrt1*発現増強も、MAP投与30分前にSCH23390を前投与することによ

って完全に抑制され、行動感作成立のドーパミンD1受容体依存性という点からも*mrt1*がこの現象に関与することが改めて支持された (Fig. 3)。

行動感作成立ラットの大脳新皮質において*mrt1*の発現増強は長期的に維持される。

行動感作の成立は薬物投与が繰り返されることによって確実になり、一旦成立すれば長期間に渡って脳の機能変化が維持される。行動感作成立の分子カスケードが薬物投与を繰り返すことによってどのような影響を受けるかについては全く不明であり、この分子カスケードへの関与が示唆される*mrt1*の大脳新皮質における発現レベルが行動感作の成立によってどうなるかは興味深い。そこで、行動感作の成立が確実に起きることを確認した条件で投薬されたラットにおける*mrt1*発現レベルを解析した結果、最終投与から2週間後においてもコントロールに比べて有意に発現が増強されていた (Fig. 4B)。この増強レベルはMAP急性単回投与1時間後におけるそれとほぼ同じであったが、急性単回投与では投与後1時間をピークとした一過性の発現増強であり、24時間後にはコントロールレベルに戻っていた (Fig. 4A)。すなわち、MAP急性単回投与では一過性の現象である*mrt1*発現増強が行動感作の成立によって長期持続性になったと考えられる。実際、行動感作の成立を阻害するSCH23390の前投与によってこの長期持続性の*mrt1*発現増強がアンタゴナイズされており、行動感作成立の有無に一致することが示された。

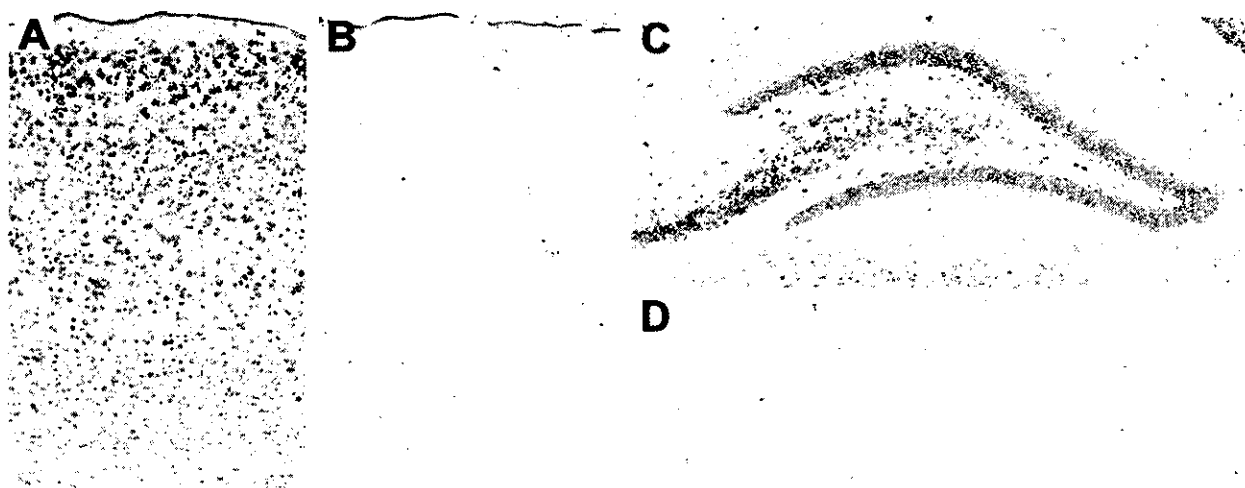


Fig. 1. Expression of *mrt1* in neuron-like cells are shown. Coronal sections were hybridized *in situ* to antisense (panels A and C) or sense (panels B and D) probe of *mrt1*. (A,B) parietal cortex; (C,D) dentate gyrus ($\times 40$).

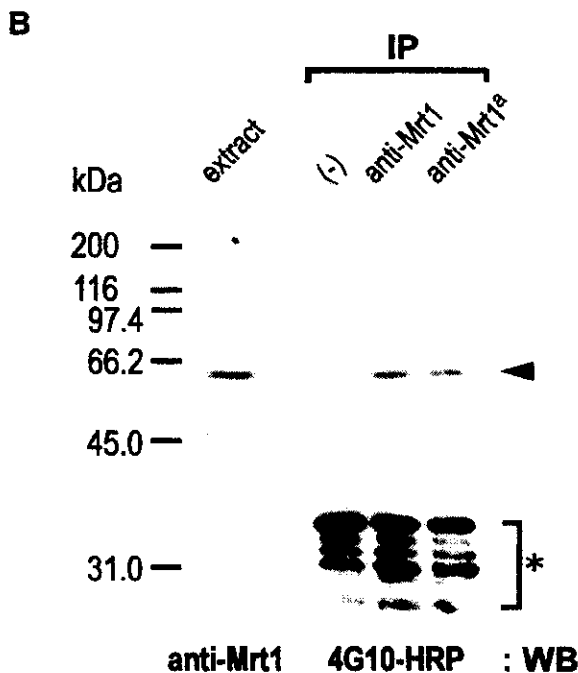
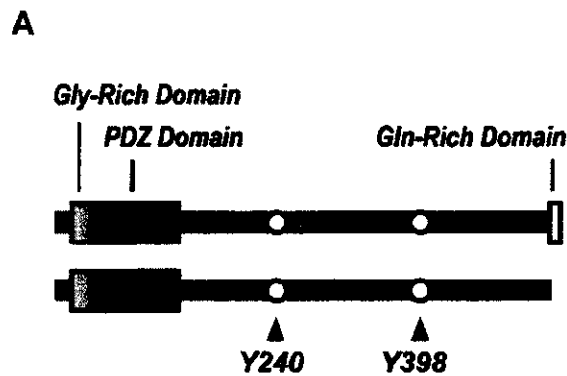


Fig. 2. Mrt1 is a novel neuronal PDZ protein with a N-terminal Gly-rich domain and presumably phosphorylated on tyrosine residues. (A) The structures of Mrt1^a (upper) and Mrt1^b (lower) are schematically represented. Y240 and Y398 are putative phosphorylation sites of protein kinases. (B) Western blot of rat brain extract or immunoprecipitated Mrt1 from the extract was probed with anti-Mrt1 antibody or anti-phosphotyrosine antibody (4G10).

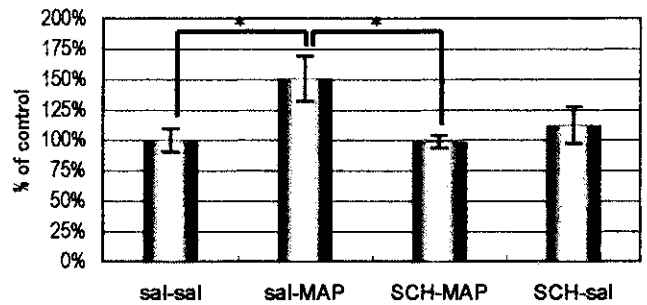


Fig. 3. MAP-augmented expression of *mrt1* in the adult rat neocortex is antagonized by SCH23390. *: $p < 0.05$.

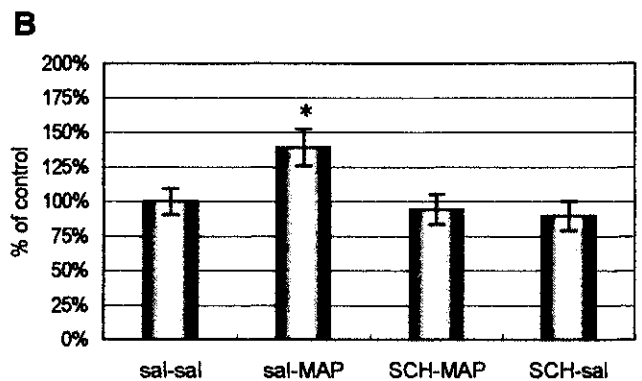
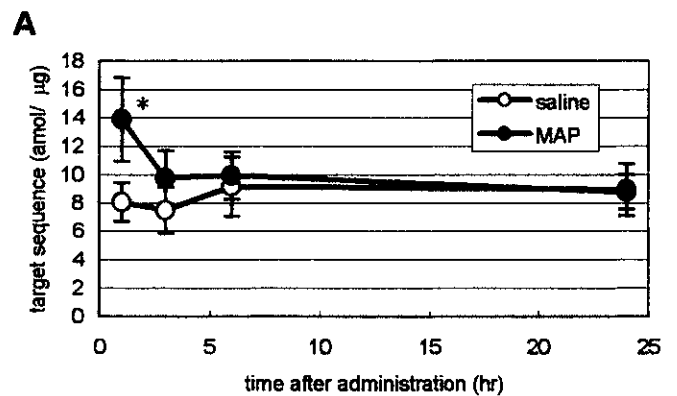


Fig. 4. Transient augmentation of *mrt1* expression by a single administration of MAP changes to long-lasting up-regulation 2 weeks after repeated daily administration. (A) The time course of *mrt1* expression after a single administration of MAP. (B) Expression levels of *mrt1* 2 weeks after daily administrations of MAP for 5 days. *: $p < 0.05$.

【考察】

ラットにおいては生後3週前後が行動感作成立の臨界期であり、覚醒剤を経験したラットがこの臨界期よりも成熟していることが必要である。また、覚醒剤による行動感作が成立した動物はコカインに対しても感作されており、その逆も成立する。すなわち、行動感作はその成立が生後発達に依存し、薬物交叉性を示す。昨年度までの解析結果から、薬物投与後の大脳新皮質における *mrt1* 発現増強はこうした行動感作の特徴とパラレルであり、加えて、*mrt1* 翻訳開始点特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内への持続的導入によって行動感作成立が阻害されることから、行動感作成立の分子カスケードを構成する要素の一つであることが示唆されていた。本年度は、MAPによる *mrt1* 発現増強がドーパミンD1受容体に依存する点が新たに明らかとなり、行動感作成立条件下に特異的な遺伝子発現変化を示す *mrt1* がこの現象に関与することがさらに支持された。

行動感作のもう一つの特徴は一旦成立すると長期に渡って持続する点であるが、このことは必ずしも遺伝子発現レベルそのものが長期持続的に変化することを意味しない。しかしながら、MAPによる大脳新皮質における *mrt1* 発現増強は急性単回投与では一過性で早い応答であるにもかかわらず、慢性投与によって少なくとも2週間という長期に渡って持続する遺伝子発現変化になることが判明した。これは、行動感作の成立によってその動物の脳内での遺伝子発現が長期持続的に変動することを示したはじめてのデータであり、行動感作の分子メカニズムを解明する上で注目すべきものである。薬物に応答した遺伝子発現レベルの一過性の変化が薬物経験を繰り返すことによって長期持続的なものへ移行するメカニズムの解析は、行動感作のみならず、広く中枢神経系が持つ可塑性の分子メカニズムを理解する一助ともなることが期待される。

Mrt1はN末端にGlyに富むドメインを持つ新しいニューロナルPDZ蛋白質であり、チロシン残基リン酸化による修飾を受けている可能性が示された。Gly-richドメイン、PDZドメインはいずれも蛋白質間相互作用を担うモチーフであり[4, 5]、また、チロシン残基のリン酸化による修飾も他の蛋白質との相互作用を制御するドメインに多く認

められる[6]。Mrt1のアミノ酸配列上には他に特定の機能を示唆するようなモチーフは見出されず、こうした蛋白質間相互作用を司る複数の異なったモチーフを持つアダプター因子として機能することが示唆される。近年、こうしたPDZドメインを持つアダプター分子は、特にニューロンにおいて、リセプターやチャンネル分子からのシグナルを伝達する複合体のスキヤフォールド分子として細胞間および細胞内情報伝達で果たす役割が注目されており、神経可塑性への関与も示唆されている[7]。今後は、ニューロンにおいてMrt1と相互作用する因子を同定し、その機能を明らかにしていきたい。

【参考文献】

- [1] 梶井 靖, 戸田重誠, 橋本隆紀, 海野麻未, 西川 徹 (1996). 中枢刺激薬と遺伝子発現. *神経精神薬理* **18**, 557-563.
- [2] Hashimoto T, Kajii Y, and Nishikawa T (1998). Psychotomimetic-induction of tissue plasminogen activator mRNA in corticostriatal neurons in rat brain. *European J Neurosci* **10**, 3387-3399.
- [3] Vezina P (1996). D1 dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **16**, 2411-2420.
- [4] Wang J, Dong Z, Bell LR (1997). Sex-lethal interactions with protein and RNA. Roles of glycine-rich and RNA binding domains. *J Biol Chem* **272**, 22227-22235.
- [5] Ranganathan R, Ross EM (1997). PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol* **7**, R770-R773.
- [6] Pawson AJ (ed) (1998). "Protein Modules in Signal Transduction". Springer (Berlin).
- [7] van Rossum D, Hanisch UK (1999). Cytoskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors? *Trends Neurosci* **22**, 290-295.

【論文発表】

[1] Shigenobu Toda, Yasushi Kajii, Mitumoto Sato, and Toru Nishikawa (2000). Reciprocal expression of infant- and adult- preferring transcripts of CDCrel-1 septin gene in the rat neocortex. (*submitted*)

【学会発表】

特別講演・シンポジウム等

[1] 梶井 靖, 平岡秀一, 藤山 航, 戸田重誠, 金田小幸, 海野麻未, 西川 徹 (1999). 逆耐性成立に関与する遺伝子群. スペシャルセッション "覚醒剤精神病の発症脆弱性". 第21回日本生物学的精神医学会大会 (仙台).

[2] 西川 徹, 梶井 靖, 藤山 航, 平岡秀一, 橋本隆紀, 海野麻未, 村岡新一郎, 黒田安計 (1999). 精神異常発現薬が引き起こす行動感作に関連する遺伝子群の探索. シンポジウム "長期神経活動による遺伝子発現とその機能解析". 第22回日本神経科学大会 (大阪).

[3] 西川 徹, 梶井 靖, 平岡秀一, 海野麻未, 村岡新一郎, 黒田安計 (1999). 分裂病の発症と再燃の分子機構へのアプローチ. シンポジウム "精神分裂病と感情障害: 病態と治療薬研究の新しい展開". 第29回日本神経精神薬理学会年会 (広島).

[4] 西川 徹, 梶井 靖, 平岡秀一, 橋本隆紀, 海野麻未, 村岡新一郎, 黒田安計 (1999). 分裂病の動物モデルとしての覚醒剤逆耐性現象と遺伝子発現. ワークショップ "神経・精神疾患研究の新展開". 第22回日本分子生物学会年会 (福岡).

[5] Yasushi Kajii, Syuichi Hiraoka, Ko Fujiyama, Shinichiro Muraoka, Shigenobu Toda and Toru Nishikawa (2000). Psychostimulant-induced behavioral sensitization and a novel rat gene *mrtl*. Symposium "Molecular genetics of Stimulant-induced

psychosis". The 3rd international congress of neuropsychiatry (Kyoto).

一般講演

[1] 平岡秀一, 梶井 靖, 西川 徹 (1999). ラット脳においてPhencyclidineによる発現誘導が発達段階依存的に増強する遺伝子の同定. 第21回日本生物学的精神医学会大会 (仙台).

[2] 藤山 航, 梶井 靖, 平岡秀一, 佐藤光源, 西川 徹 (1999). メタンフェタミン繰り返し投与後の $mrtl$ 発現増強. 第22回日本神経科学大会 (大阪).

[3] Shigenobu Toda, Yasushi Kajii, Koyuki Kaneda, Asami Umino, Mitumoto Sato, and Toru Nishikawa (1999). Developmentally regulated expression of a gene for PNUT/Septin-like protein in rat brain. Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry and the European Society for Neurochemistry (Berlin).

[4] Shigenobu Toda, Yasushi Kajii, Koyuki Kaneda, Asami Umino, Mitumoto Sato, and Toru Nishikawa (1999). Novel variants of the gene encoding PNUT/Septin-like protein expressed in adult rat brain. Society for Neuroscience 29th Annual Meeting (Miami Beach).

[5] 平岡秀一, 梶井 靖, 西川 徹 (2000). Phencyclidineおよび各種向精神薬投与時における97kDa Synapse-Associated Protein遺伝子の発現. 第22回日本生物学的精神医学会大会 (東京).

[6] 村岡新一郎, 梶井 靖, 西川 徹 (2000). メタンフェタミンに対する $mrtl$ の応答はD-1受容体に依存する. 第22回日本生物学的精神医学会大会 (東京).

5. 分担研究者氏名一覽

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 9-11 年度）

| 区分 | 氏名 | 所属施設・部局・職名 | 所属施設所在地 |
|----|------|--------------------------------------|--|
| 主任 | 佐藤光源 | 東北大学大学院医学系研究科 精神神経学分野教授 | 〒 980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1 Tel 022-717-7260 Fax 022-717-7266 |
| 分担 | 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 | 〒 187-8551 小平市小川東町4-1-1 Tel 0423-46-1714 Fax 0423-46-1744 |
| 分担 | 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 | 〒 272-8516 市川市国府台1-7-3 Tel 047-372-0141 Fax 047-371-2900 |

19990408

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

1. Kikuchi, S., Iwasa, H., and Sato, T., (1997) Changes in N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA expression level in the cerebral cortex of amygdaloid-kindled rats. *Chiba Med. Journal* (1997) 73 (25-31)
2. Suzuki, K., Iwasa, H., Kikuchi, S., Sato, T., Miyake, M., Morinaga, N., Noda, M. (1997) The contribution of endogenous mono-ADP-ribosylation to kindling-induced epileptogenesis. *Brain Res*, 745, 109-113.
7. 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*. 818.570-4.1999.
- H. Nakamura, T. Hishinuma, Y. Tomioka, S. Ishiwata, T. Ido, R. Iwata, Y. Funaki, M. Itoh, T. Fujiwara, K. Yanai, M. Sato, Y. Numachi, S. Yoshida, M. Mizugaki: Effects of haloperidol and cocaine pretreatments on brain distribution and kinetics of [¹¹C] methamphetamine in methamphetamine-sensitized dog: application of PET to drug pharmacokinetic study. *Nuclear Medicine and Biology*, 24, 165-169, 1997.
- Yoshida, S., Numachi, Y., Matsuoka, H. Sato, M. Impairment of cliff avoidance reaction induced by subchronic methamphetamine administration and restraint stress: comparison between two inbred strains of rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.*, 22, 1023-1032, 1998.
- Yoshida, S., Numachi, Y., Matsuoka, H., Sato, M.: The absence of impairment of cliff avoidance reaction induced by subchronic methamphetamine treatment in mice. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, in press.
- 沼知陽太郎, 佐藤光源. ストレス逆耐性仮説. *こころの臨床*, 17, 53-55, 1998.
- 佐藤光源. ストレス脆弱性をどうとらえるか. *臨床精神医学*, 28, 251-253, 1999.
- 沼知陽太郎, 吉田寿美子, 松岡洋夫, 佐藤光源: 興奮剤. *別冊日本臨床*, 領域別症候群シリーズ27, 523-526, 1999
- 戸田重誠, 吉田寿美子, 沼知陽太郎, 松岡洋夫, 佐藤光源 (分担執筆): 分裂病のストレス脆弱性と逆耐性現象. *精神医学レビュー* No.33 精神障害における心因 (高橋徹編), p.13-20, ライフ・サイエンス, 2000
- [1] 平岡秀一, 梶井 靖, 海野麻未, 西川 徹 (1997). 精神分裂病の動物モデル. *ブレインサイエンス* 8, 399-407.
- [2] 掛山正心, 橋本隆紀, 平岡秀一, 梶井 靖, 西川 徹 (1998). NMDA受容体サブユニットmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによるmethamphetamine逆耐性現象の形成阻害. *精神薬療基金研究年報* 29, 32-36.
- [3] Takanori Hashimoto, Yasushi Kajii, and Toru Nishikawa (1998). Psychotomimetic-induction of tissue plasminogen activator mRNA in corticostriatal neurons in rat brain. *European J Neurosci* 10, 3387-3399.