

- increases diazepam binding inhibitor (DBI) mRNA in primary cultured neurons. *Neurosci. Lett.* 168: 1-4, 1994.
- 10) Cox E.H., Kerbusch T., van der Graaf P.H., et al.: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the electroencephalogram effect of synthetic opioids in the rat: correlation with the interaction at the *mu*-opioid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284: 1095-1103, 1998.
 - 11) 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.
 - 12) Katsura M., Ohkuma S., Tsujimura A., et al.: Increase of diazepam binding inhibitor mRNA levels in the brains of chronically ethanol-treated and -withdrawn mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273: 1529-1533, 1995.
 - 13) 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.
 - 14) Katsura M., Ohkuma S., Xu J., et al.: Continuous treatment with nicotine increases diazepam binding inhibitor (DBI) and its mRNA in the mouse brain. *Mol. Brain Res.* 55: 345-349, 1998.
 - 15) Suzuki T., Hayashi Y. and Misawa M.: The role of μ 1 receptor in physical dependence on morphine using the μ receptor deficient CXBK mouse. *Life Sci.* 50: 849-856, 1992.

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：薬物依存における細胞内情報伝達物質の役割：
モルヒネの依存形成に対するデハイドロエピアンドロステロン
硫酸塩の抑制作用：脳内シグナル伝達系の関与

主任研究者：鍋島俊隆^{1) 2)}

研究協力者：野田幸裕^{1) 2)}，間宮隆吉¹⁾，任 修海¹⁾，
永井 拓¹⁾，亀井浩行^{1) 2)}

名古屋大学大学院医学研究科医療薬学¹⁾，医学部附属病院薬剤部²⁾

研究要旨

ニューロステロイドのデハイドロエピアンドロステロン硫酸塩(DHEAS)はモルヒネの依存形成を抑制することが報告されている。また、モルヒネの依存形成に cyclic AMP (cAMP)および extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)カスケードが関与していることが示唆されている。そこで本研究では、モルヒネ依存形成に対する DHEAS の抑制作用にこれらのカスケードが関与しているかどうかについて調べた。モルヒネ(10 mg/kg 1日2回5日間)を連続投与したマウスにナロキソン(1 mg/kg)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。DHEAS(10 mg/kg)とモルヒネを連続併用投与したマウスでは、モルヒネ連続投与マウスと比較して、ナロキソン誘発退薬症状の発現回数は有意に減少し、この DHEAS の作用は、シグマ₁受容体拮抗薬の NE-100(5 mg/kg)によって拮抗された。一方、モルヒネ連続投与マウスにおいて退薬症状を示したマウスの脳内 cAMP 含量、c-fos mRNA、phosphorylated ERK2 蛋白の発現量は、saline 連続投与マウスと比較して有意に増加していた。DHEAS とモルヒネを連続併用投与したマウスでは、モルヒネ連続投与マウスと比較して、脳内 cAMP 含量には差は認められなかったが、c-fos mRNA、phosphorylated ERK2 蛋白の発現量は減少していた。以上の結果から、モルヒネの依存形成に対する DHEAS の抑制作用はシグマ₁受容体を介するシグナル伝達系、特に ERK カスケードが関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、デハイドロエピアンドロステロン(DHEA)やプレグネノロン (PREG)などのステロイドホルモンは、血漿中よ

りも脳内に高濃度存在すること、また、これらは脳内でコレステロールから合成されるため、これらの脳内濃度は副腎や性腺の機能状態に影響されにくい

ことが明らかにされている(Baulieu, 1981). この脳内で合成されるステロイドホルモンは末梢内分泌腺から産生されるステロイドホルモンと区別してニューロステロイドと命名され, 新しい神経調節物質として注目されるようになった. これまでの研究から, ニューロステロイドは情動や記憶などの高次脳神経機能を調節していると考えられている. また, DHEA 硫酸塩 (DHEAS) はモルヒネの依存形成を抑制することが報告されている (Reddy and Kulkarni, 1997) が, その抑制作用の発現機序についてはまだ明らかにされていない.

麻薬性鎮痛薬であるモルヒネは, ヒトにおいて連用により薬物依存 (精神・身体依存) を引き起こすことが知られている. また, 実験動物においては, 自己投与, 弁別刺激効果あるいは連続投与後の休薬により退薬症状 (Di Chiara and North, 1992) を発現する. 近年, 分子生物学的手法の発展により *in vitro* の薬物依存, 特にモルヒネ依存の形成メカニズムの解明がなされており, これらの研究からモルヒネ依存形成に脳内 cyclic AMP (cAMP) 系の関与が報告されている. 特に, 細胞内での cAMP から始まる cAMP response element (CRE) binding protein (CREB), CRE および標的遺伝子転写の開始へと続く一連のカスケードが, 共通の情報伝達系として注目されている (Nestler, 1993). さらに, 最近では extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) カスケードが関与していることも示唆されている (Ortiz et al., 1995; Schulz and Holtt, 1998). そこで本研究では,

in vitro の実験により得られた結果に基づき, モルヒネ依存形成に対する DHEAS の抑制作用にこれらのカスケードが関与しているかどうかについて *in vivo* で調べた.

B. 方法

B-1. 動物および薬物

ICR 系の雄性マウス (6 週齢) (日本 SLC) を, 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.

モルヒネ HCl (塩野義製薬) およびナロキソン HCl (Sigma) は生理食塩水に, NE-100 (大正製薬) は, 蒸留水に, デハイドロエピアンドロステロン硫酸塩 (DHEAS: Sigma) は, 1% DMSO で溶解した.

B-2. モルヒネ連続投与マウスにおけるナロキソン誘発退薬症状

モルヒネ (10 mg/kg s.c.) を 1 日 2 回, 5 日間マウスに連続投与した. 6 日目にはモルヒネ連続投与マウスにモルヒネ (10 mg/kg s.c.) を投与し, 投与 2 時間後にナロキソン (1 mg/kg i.p.) を投与した. ナロキソン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.

DHEAS (10 mg/kg i.p.) およびシグマ₁ 受容体拮抗薬の NE-100 (5 mg/kg i.p.) は, それぞれモルヒネ投与 30 および 45 分前に投与した [モルヒネ連続投与期間 (5 日間) および 6 日目].

B-3. 脳内 cAMP 量の測定

退薬症状を示したマウスおよび DHEAS とモルヒネを連続併用投与したマウスにマイクロウェーブを照射し、断頭により摘出した各脳分画からサンプルを調製し、Pharmasia Biotech の cAMP 測定用酵素免疫検定キットを用いて脳内 cAMP 含量を測定した。

B-4. c-fos mRNA および phosphorylated ERK 蛋白の発現量の測定

退薬症状を示したマウスおよび DHEAS とモルヒネを連続併用投与したマウスを断頭し、摘出した各脳分画からサンプルを調製し、c-fos mRNA の発現量は RT-PCR 法を用いて、phosphorylated ERK1 および ERK2 蛋白の発現量は Western blotting 法を用いて測定した。

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は、Dunnett の多重比較検定法（行動実験）および Student の t 検定法（RT-PCR および Western Blotting 実験）を用いて行い、 $P < 0.05$ であるものを有意であるとした。

C. 結果

C-1. モルヒネ依存マウスにおけるナロキソン誘発退薬症状に対する DHEAS の作用

モルヒネ (10 mg/kg) を連続投与したマウスにナロキソン (1 mg/kg) 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 (Fig. 1)。DHEAS (10 mg/kg) とモルヒネを連続併用投与したマウスでは、モルヒネ連続投与マウスと比較して、ナロキソン誘発退薬症状の発現回数は有意に減少し、この DHEAS の作用は、シグマ₁ 受容体拮抗薬の NE-100 (5 mg/kg) によって拮抗された (Fig. 1)。

C-2. モルヒネ依存マウスにおけるナロキソン投与後の脳内 cAMP 含量、c-fos mRNA の発現量および phosphorylated ERK 蛋白量の変化

モルヒネ連続投与マウスにおいて退薬症状を示したマウスの視床における cAMP 含量 (Fig. 2)、視床と皮質における c-fos mRNA の発現量 (Fig. 3) および皮質における phosphorylated ERK2 蛋白の発現量 (Fig. 4) は、saline 連続投与マウスのそれらと比較して増加していた。

DHEAS とモルヒネを連続併用投与したマウスでは、モルヒネ連続投与マウスと比較して、視床における cAMP 含量には差は認められなかったが (Fig. 2)、視床における c-fos mRNA (Fig. 3) および皮質における phosphorylated ERK2 蛋白の発現量 (Fig. 4) は減少していた。

D. 考察

ニューロステロイドの DHEAS は、当初 GABA_A 受容体の機能を調節することが見出されたが (Lambert et al., 1995)、最近、GABA_A 受容体以外に多彩な生理作用に参与しているシグマ₁ 受容体にも作用することが見出されている (Bergeron et al., 1996; Maurice et al., 1996; Monnet et al., 1995)。シグマ₁ 受容体

は様々な神経系に対して調節的に働き、抗ストレス作用、学習・記憶障害改善作用や神経細胞保護作用に関与していることが示唆されている(Maurice and

Lockhart, 1997)が、現在のところ、シグマ₁受容体と薬物依存との関係関係については明らかにされていない。

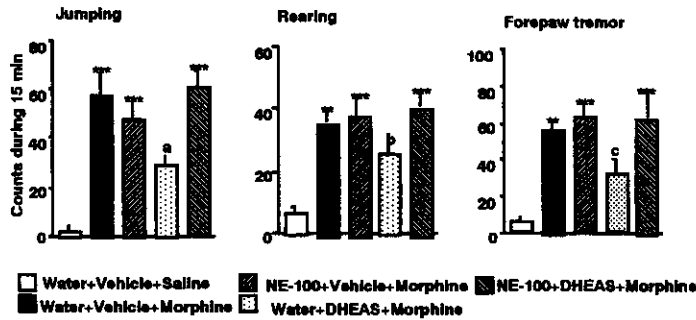


Figure 1. The selective σ_1 receptor antagonist NE-100 (5 mg/kg) reverses the attenuating effects of co-administration of DHEAS (10 mg/kg) with morphine on naloxone-precipitated withdrawal syndrome. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs (Water+Vehicle+Saline); a: $P < 0.01$, 0.01 and 0.001 vs (Water+Vehicle+Morphine), (NE-100+Vehicle+Morphine) and (NE-100+DHEAS+Morphine) respectively; b: $P < 0.01$, 0.05 and 0.01 vs (Water+Vehicle+Morphine), (NE-100+Vehicle+Morphine) and (NE-100+DHEAS+Morphine); c: $P < 0.05$ vs (Water+Vehicle+Morphine), (NE-100+Vehicle+Morphine) or (NE-100+DHEAS+Morphine) ($n = 6-12$).

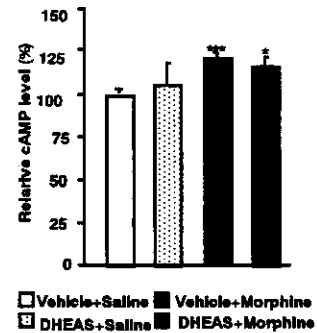


Figure 2. Effects of repeated co-administration of DHEAS with morphine on the cAMP levels in the thalamus of morphine-dependent mice. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs (Vehicle+Saline) ($n=6-12$).

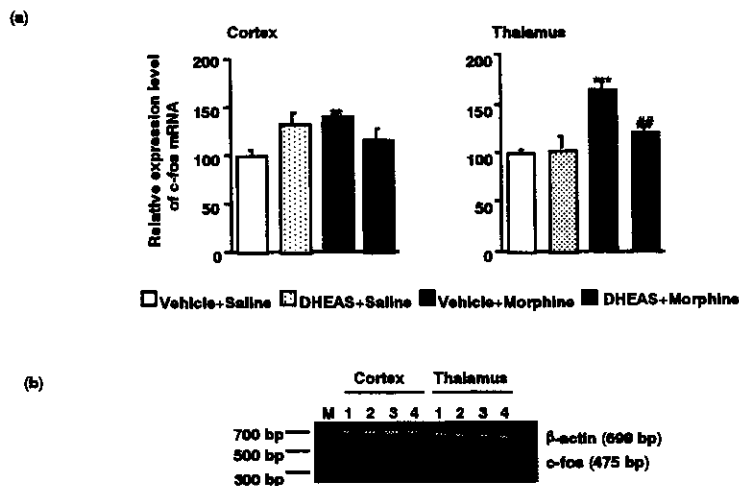


Figure 3. (a). The relative expression levels of c-fos mRNA in the cortex and thalamus of the mice following different treatments. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs (Vehicle+Saline), ## $P < 0.01$ vs (Vehicle+Morphine) ($n = 6-10$, 3-6 independent RT-PCR analyses). (b). A representative picture showing the RT-PCR amplification of c-fos mRNA and the internal standard β -actin mRNA. Lanes M, 1, 2, 3 and 4 represent molecular weight marker (100 bp DNA ladder), (Vehicle+Saline), (DHEAS+Saline), (Vehicle+Morphine), and (DHEAS+Morphine), respectively.

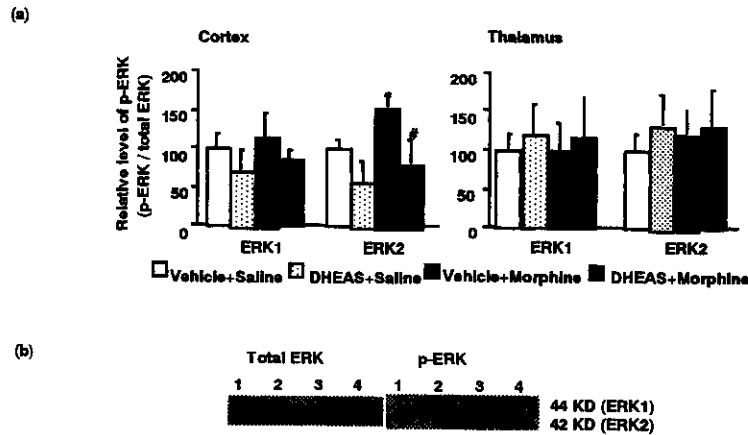


Figure 4. The effects of DHEAS (10 mg/kg) on the phosphorylation of ERKs in the cortex and thalamus of morphine-dependent mice following naloxone-precipitated withdrawal. The ratio of phosphorylated ERK (p-ERK) to total ERK is shown in (a). (b): A representative picture showing that DHEAS prevented withdrawal-induced phosphorylation of ERK2 in the cortex. * $P < 0.05$ vs (Vehicle+Saline) group. # $P < 0.05$ vs (Vehicle+Morphine) group. Lanes 1, 2, 3 and 4 represent (Vehicle+Saline), (Vehicle+Morphine), (DHEAS+Saline), and (DHEAS+Morphine), respectively ($n = 3-6$).

本研究において、モルヒネ依存マウスにナロキソンを投与すると、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。しかし、DHEAS とモルヒネを連続併用投与しておいたマウスでは、ナロキソン誘発逃避跳躍行動、前肢振戦の発現回数が、有意に減少し、この結果は Reddy and Kulkarni(1997)の報告と一致していた。このDHEASの抑制作用は、シグマ₁受容体拮抗薬のNE-100によって拮抗されたことから、DHEASによるモルヒネ依存形成の抑制作用は、シグマ₁受容体を介して発現していることが示唆される。

オピオイド受容体を有する培養細胞の培液中にモルヒネを添加すると、細胞のアデニル酸シクラーゼ活性が抑制さ

れるが、持続的にモルヒネを添加すると、代償的にアデニル酸シクラーゼ活性は上昇する(Sharma et al., 1975)。今回の実験においてナロキソン誘発退薬症状を示したモルヒネ連続投与マウスにおいて、以前の報告(Mamiya et al., 2000)と同様に脳内cAMP量は増加していた。しかし、DHEAS連続併用処置マウスにおいても脳内cAMP量は増加していたことから、DHEAS連続併用投与によるナロキソン誘発退薬症状の抑制にcAMPシグナル伝達系の関与は少ないものと思われる。

最近、モルヒネ依存の形成には、cAMPシグナル伝達系ばかりでなく、他のシグナル伝達系、例えばMAPカイネース系が関与していることが示唆されている

(Ortiz et al. 1995; Schulz and Holtt, 1998). すなわち, モルヒネ連続投与ラットにおいて脳内 ERK 量の増加およびモルヒネ連続投与マウスにナロキソンを投与すると MAP カイネースの活性化が認められる. 本実験においても, ERK カスケード系の関与を調べたところ, ナロキソン誘発退薬症状を示したマウスの脳内 phosphorylated ERK2 量は増加していた. しかし, DHEAS 連続併用処置マウスにおいては, このような phosphorylated ERK2 蛋白量の増加は認められなかった. さらに, ナロキソン誘発退薬症状を示したマウスの c-fos mRNA 量の増加も抑制された. 今回の結果から, モルヒネ依存マウスにおける DHEAS によるナロキソン誘発退薬症状の抑制作用の発現機序として以下の仮説が考えられる. すなわち, モルヒネを連続投与すると cAMP および ERK シグナル伝達系が促進され, 標的となる遺伝子の転写を促進する. しかし, DHEAS を連続併用投与されているマウスにおいては, これらの情報伝達系のうち, ERK シグナル伝達系の促進が認められないので, 依存が形成されなかったものと推察される. しかし, DHEAS がどのように ERK シグナル伝達系に影響を与えるかは, 今後さらに検討する必要がある.

E. 結論

本研究において,

1. モルヒネ誘発身体依存形成過程には, 脳内 cAMP および ERK シグナル伝達系が重要な役割を果たしている.
2. ニューロステロイドの DHEAS によ

るモルヒネ依存形成抑制機序には, 脳内 cAMP でなく, ERK シグナル伝達系が関与している.

ことが見出された.

[引用文献]

- 1) Baulieu E.E.: Steroid hormones in the brain: several mechanisms? In: Steroid Hormone Regulation of the Brain (ed. by Fuxe K., Gustafson J.A. and Wettenberg L.), pp.3-14, Pergamon Press, Oxford, 1981.
- 2) Bergeron R., Montigny C. and Debonnel G.: Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effect mediated via sigma receptors. *J. Neurosci.*, 16: 1193-1202, 1996.
- 3) Di Chiara G. and North R.A.: Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13: 185-193, 1992.
- 4) Lambert J.J., Belelli D., Hill-Venning C. et al.: Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16: 295-303, 1995.
- 5) Mamiya T., Noda Y., Noda A. et al.: Effects of sigma receptor agonists on the impairment of spontaneous alternation behavior and decrease of cyclic GMP level induced by nitric oxide synthase inhibitors in mice. *Neuropharmacology*, 39: in

- press, 2000.
- 6) Maurice T., Phan V.-L., Urani A. et al.: Neuroactive neurosteroids as endogenous effectors for the σ_1 (σ_1) receptor: pharmacological and evidence and therapeutic opportunities. *Jpn. J. Pharmacol.*, 81: 125-155, 1999.
 - 7) Maurice T., Roman F.J. and Privat A.: Modulation by neurosteroids of the in vivo (+)-[³H]SKF-10,047 binding to σ_1 receptors in the mouse forebrain. *J. Neurosci. Res.*, 46: 734-743, 1996.
 - 8) Monnet F.P., Mahe V., Robel P. et al.: Neurosteroids, via σ receptors, modulate the [³H]-norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation in rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 3774-3778, 1995.
 - 9) Nestler E.J.: Cellular responses to chronic treatment with drugs of abuse. *Critical Rev. in Neurobiol.*, 7: 23-39, 1993.
 - 10) Ortiz J., Harris H.W., Guitart X. et al.: Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by morphine. *J. Neurosci.*, 15:1285-1297, 1995.
 - 11) Reddy D.S. and Kulkarni S.K.: Chronic neurosteroid treatment prevents the development of morphine tolerance and attenuates abstinence behavior in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 337:19-25 1997.
 - 12) Schulz S. and Holtt V.: Opioid withdrawal activates MAP kinase in locus coeruleus neurons in morphine-dependent rats in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, 10:1196-1201, 1998.
 - 13) 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.

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題：Methamphetamine 誘発数種薬理作用の遺伝解析

分担研究者：鈴木 勉

研究協力者：成田 年、矢島 義識

星薬科大学薬品毒性学教室

[研究要旨]

薬物の薬理作用の発現は遺伝因子により大きな影響を受けることが知られている。近年、recombinant inbred (RI) マウスが開発され、薬理作用の発現に関与する染色体およびその遺伝子座の同定が可能となった。そこで、本研究では、近交系である A/J および SM/J 系マウスを祖先系統とする SMXA RI マウスを用いて、methamphetamine (MAP) の数種薬理作用の発現に関与する染色体およびその遺伝子座の同定を行った。MAP (2 mg/kg, s.c.) 処置により A/J 系マウスにおいては有意な報酬効果が発現した。しかしながら、SM/J 系マウスにおいては有意な報酬効果も嫌悪効果も認められなかった。SMXA RI マウスを用いて同様の検討を行った結果、methamphetamine により嫌悪効果を示す系統から強い報酬効果を示す系統までほぼ連続的な分布を示した。これらの結果をもとに遺伝解析を行った結果、第 2、17、18 および 19 染色体上の 5 遺伝子座の関与が示唆された。また、MAP (2 mg/kg, s.c.) 誘発自発運動促進作用は A/J よりも SM/J 系マウスの方が有意に強度であった。そこで、SMXA RI マウスを用いて同様の検討を行った結果、methamphetamine によりほとんど自発運動促進作用の認められない系統から強い自発運動促進作用を示す系統までほぼ連続的な分布を示した。これらの結果をもとに遺伝解析を行った結果、第 10 および 11 染色体上の 3 遺伝子座の関与が示唆された。さらに、MAP (2 mg/kg, s.c.) 反復投与により A/J 系マウスでは MAP 自発運動促進作用に対する有意な逆耐性形成が認められたのに対し、SM/J 系マウスでは逆耐性は形成されなかった。そこで、SMXA RI マウスを用いて同様の検討を行った結果、methamphetamine 反復投与により自発運動量の低下が認められた系統から強い逆耐性が形成された系統までほぼ連続的な分布を示した。これらの結果をもとに遺伝解析を行った結果、第 3 染色体上の 2 遺伝子座の関与が示唆された。以上、本研究の結果より、MAP の種々の薬理作用の発現に関与する可能性のある遺伝子座およびその候補遺伝子を明らかにした。

A. 目的

近年、いくつかの薬理遺伝学的検討により ethanol および cocaine な

どの依存性薬物の薬理作用発現に遺伝因子の関与が示唆されている (1-3)。一方、methamphetamine の自発運動

促進作用などについても近交系マウス間に著明な系統差が存在することが報告されている (4)。これらのことより、methamphetamine の薬理作用発現に遺伝因子が関与している可能性が考えられている。しかしながら、具体的に染色体上のどの遺伝子座が methamphetamine 依存に関与しているのかについて明確にするためには recombinant inbred (RI) 動物を用いた詳細な検討が必要である。

RI 動物とは互いに血縁関係のない 2 種の近交系動物を交配して得られた F1 をさらに F1 同士交配して F2 を獲得し、この F2 をそれぞれ形質の違いにより分類して 20 世代以上兄妹交配を繰り返すことによって得られる動物である。このような RI 動物ではそれぞれの染色体の遺伝子座がどちらの親系統に由来したものであるかを示した各遺伝子座における系統間分布パターン (strain distribution patterns: SDP) が作成されている。親系統において異なる形質が存在する場合、その形質について RI 動物を用いて検討を行い、その結果を SDP と比較することにより、その形質に関与する遺伝子座について検討することができる (5)。さらに、その遺伝子座の付近に存在する遺伝子を調べることによりその形質における候補遺伝子を推定することが可能である。このような RI 動物を用いた依存性薬物に関する検討は欧米では盛んに行われており、BXD RI マウスを用いた検討により alcohol および cocaine などの数種薬理作用に関与が示唆される遺伝子座が報告さ

れている (6, 7)。

近年、西村ら (8) によって 26 系統からなる SMXA RI マウスが開発された。この親系統である SM 系と A 系の間には腫瘍の発生率、運動量、体重などに明らかな系統差が存在することが報告されている (9)。これらの SMXA RI マウスにおいては、染色体上の遺伝子座がどちらの親系統に由来しているか判明しているものが 1032 遺伝子座と多く、また、その SDP が作成されているため、遺伝解析に非常に有用であると考えられる。

そこで本研究ではこの SMXA RI マウスを用い、methamphetamine 誘発報酬効果について検討を行い、methamphetamine 誘発数種薬理作用発現に関与する候補遺伝子の探索を試みた。

B. 方法

1. 使用動物および飼育条件

本研究では、7-8 週齢の SM/J 系、A/J 系および 26 系統の SMXA RI 系雄性マウス (名古屋大学医学部附属動物実験施設：西村正彦教授より提供) を使用した。飼育条件は摂餌 (固形飼料 MF：オリエンタル酵母工業、東京) および飲水 (水道水) とともに自由とし、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ の恒温室にて、8:00 a.m. 点燈、8:00 p.m. 消燈の 12 時間サイクルの明暗条件とした。

2. 使用薬物

実験には methamphetamine hydrochloride (大日本製薬、大阪) を使用した。Methamphetamine は原末を生理食塩液 (大塚製薬、東京) に溶解

し、マウスの体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で背部皮下 (s.c.) に投与した。なお、薬物の用量はすべて塩として表記した。

3. Methamphetamine 誘発報酬効果

報酬効果の測定は conditioned place preference 法に従い、白黒の 2-compartment box (15 x 30 x 15 cm) を使用した。この box は暗くて床面が粗い場所を好むマウスの性質を考慮して、一方の区画は黒色で床面は滑らかに、もう一方は白色で床面は凸凹に加工されている。なお、すべての実験はこのシャトルボックスを防音箱に入れ、薄暗い照明下 (約 35 lux) でホワイトノイズを発生させて行った。

条件づけはカウンターバランス方式に従って行った。すなわち、マウスに methamphetamine (2 mg/kg) あるいは溶媒である生理食塩液を皮下投与して一方の区画に 50 分間閉じ込め、翌日には前日とは異なる処置を行い、もう一方の区画に 50 分間閉じ込めた。この一連の操作を 1 session として、計 2 session の条件づけを行った。実験手順による偏りを避けるため、最初に薬物を投与する群と最初に生理食塩液を投与する群をそれぞれ設けた。また、区画についても同様に最初に白の区画に入れる群と最初に黒の区画に入れる群を設けた。

4 日間の条件づけの後、5 日目に box の区画の仕切り板を床から 6 cm の高さまで引き上げ、box の中央境界部に金属製プラットホーム (1.5 x 3 x 6 cm) を設置し、マウスが各区画に

自由に出入りできる状況にした後、薬物および生理食塩液のいずれも投与せずに 15 分間にわたり各区画への滞在時間を計測した。試験時における薬物処置区画への滞在時間と生理食塩液処置区画への滞在時間との差を CPP score (sec) として算出し、これを報酬効果の指標とした。

4. Methamphetamine 誘発自発運動促進作用およびその逆耐性の形成

自発運動量の測定は tilting cage 法に従って行った。この方法はバケツ型ケージの中にマウスを入れ、マウスの動きに伴う傾きをマイクロスイッチを介してカウントし、これを自発運動量として測定するものである。薬物投与前にマウスをケージに 1 匹ずつ入れ、30 分間新規環境に適應させた。その後、生理食塩液あるいは methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) を投与し、投与後の自発運動量を 10 分間隔で 180 分間にわたり連続的に測定した。自発運動量は平均値 \pm 標準誤差として表示し、生理食塩液投与時の自発運動量を 100 % として methamphetamine 処置後の運動量の変化を自発運動促進作用の指標とした。また、methamphetamine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性を検討するため、生理食塩液あるいは methamphetamine を 3 日おきに 7 回投与し、同様に自発運動量を測定した。また、methamphetamine 単回投与時の自発運動量を 100 % として methamphetamine 処置 7 回目の運動量の変化を逆耐性形成の指標とした。

5. Methamphetamine 誘発数種薬理作用の遺伝解析

遺伝解析は SMXA RI マウスの SDP を基にして作成された解析ソフトである Map Manager QTb29 を使用し、interval mapping を行った (10, 11)。Interval mapping は最尤法に基づく解析法で、どの遺伝子座が表現型とともに伝達されるかを統計学的に解析する方法である (12, 13)。すなわち、ある表現型と連鎖して伝達される遺伝子座の付近にその候補遺伝子が存在することを推察することができる。この連鎖の確率の目安として尤度 (likelihood ratio statistic; LRS) が用いられており、大きい LRS を示した遺伝子座ほどその表現型に対する関与の度合いが大きいと考えられる。今回の解析では interval mapping を行う前に permutation test (1000 回繰り返し) を行い、基準となる LRS 値を決定した。この基準値 -2 までの値を示した遺伝子座に着目し、その遺伝子座付近に存在する候補遺伝子を検索した。

6. 統計処理

値はすべて平均値 \pm 標準誤差として表示した。統計学的有意差検定は二元配置分散分析を行った後、Bonferroni / Dunn 検定を行った。

C. 結果

1. Methamphetamine 誘発報酬効果

A/J 系および SM/J 系マウスにおける methamphetamine 誘発報酬効果を検討した結果、A/J 系および SM/J 系マウスにおける 生理食塩液処置に

よる CPP score はそれぞれ -22.0 ± 100.0 および -3.4 ± 42.9 sec であり、両系統ともに報酬効果あるいは嫌悪効果のいずれも認められなかった。また、methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) により誘発される報酬効果はそれぞれ 298.2 ± 60.8 および -14.5 ± 46.5 sec であり、A/J 系においては生理食塩液処置と比較して有意な ($p < 0.01$) 報酬効果が認められた。しかしながら SM/J 系においては有意な報酬効果は認められなかった。次に、26 系統の SMXA RI マウスにおける methamphetamine 誘発報酬効果を検討した。Methamphetamine 処置により SMXA-14 のように -134.2 ± 40.6 sec と嫌悪効果を示す系統から SMXA-19 のように 198.1 ± 36.7 sec と強い報酬効果を示す系統まではほぼ連続的な分布が認められた。

2. Methamphetamine 誘発報酬効果の遺伝解析

Map Manager QTb29 を用いて permutation test により算出した LRS は 9.7 を示した。これを基準として interval mapping により遺伝解析を行った結果、methamphetamine 誘発報酬効果発現に関与が示唆される遺伝子座として第 2 染色体上の D2Mit28、第 17 染色体上の D17Mit68、第 18 染色体上の NaSM30、第 19 染色体上の NaA61 および D19Mit46 にそれぞれ 7.9、8.8、7.7、8.7 および 9.4 と基準には達しないものの高い LRS が検出された。これらの結果から、methamphetamine 誘発報酬効果の発現にはこれらの遺伝子座上に存在す

る phospholipase C β 1, β 3 および β 4 の遺伝子が候補遺伝子として確認された。

3. Methamphetamine 誘発自発運動促進作用

A/J 系および SM/J 系マウスにおける methamphetamine 誘発自発運動促進作用を検討した結果、A/J 系および SM/J 系マウスにおける生理食塩液処置による自発運動量はそれぞれ 64.3 ± 16.4 および 410.0 ± 101.1 であった。Methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) 処置後の自発運動はそれぞれ 194.2 ± 76.1 および 2132.3 ± 362.5 であり、両系統において、生理食塩液処置と比較して有意な ($p < 0.01$) 自発運動促進作用が認められた。しかしながらその増加の程度には著明な差が認められた。次に、26 系統の SMXA RI マウスにおける methamphetamine 誘発自発運動促進作用を検討した。SMXA-24 のように 162.5 % と methamphetamine 処置によってもほとんど自発運動促進作用の認められない系統から SMXA-10 のように 6055.0 % と強い自発運動促進作用を示す系統までほぼ連続的な分布が認められた。

4. Methamphetamine 誘発自発運動促進作用の遺伝解析

Map Manager QTb29 を用いて permutation test により算出した LRS は 7.0 を示した。これを基準として interval mapping により遺伝解析を行った結果、methamphetamine 誘発自発運動促進作用発現に関与が示唆さ

れる遺伝子座として第 10 染色体上の NaA208 に 7.5 と基準を上回る LRS が検出された。また、第 11 染色体上の D11Mit214 および D11Mit12 にそれぞれ 6.7 と基準には達しないものの高い LRS が検出された。これらの結果から、methamphetamine 誘発報酬効果の発現にはこれらの遺伝子座上に存在する NMDA receptor NR2C subunit の遺伝子が候補遺伝子として確認された。

5. Methamphetamine 誘発自発運動促進作用の逆耐性形成

A/J では、methamphetamine の投与回数に依存した有意な自発運動量の増加、すなわち逆耐性の形成がみられた。特に、methamphetamine 投与 7 回目の自発運動量は、methamphetamine 投与 1 回目の自発運動量と比較して 1570 % と有意な増加を示した ($p < 0.001$)。一方、SM/J では methamphetamine を反復投与することによっても、自発運動促進作用の増加は認められなかった。

また、SMXA RI における methamphetamine 反復投与による自発運動促進作用の逆耐性形成は、SMXA-1 の -54.1 % から SMXA-22 の 176.5 % まで連続的な結果が得られた。

6. Methamphetamine 誘発自発運動促進作用の逆耐性形成の遺伝解析

Map Manager QTb29 を用いて permutation test により算出した LRS は 9.8 を示した。これを基準として interval mapping により遺伝解析を行

った結果、methamphetamine 誘発自発運動促進作用の逆耐性形成に関与が示唆される遺伝子座として第 3 染色体上の NaSM89 および NaA93 に 8.9 と基準には達しないものの高い LRS が検出された (Fig. 1-4, Fig. 1-5)。これらの結果から、methamphetamine 誘発自発運動促進作用の逆耐性形成にはこれらの遺伝子座上に存在する phosphoinositide 3-kinase および phospholipase D の遺伝子が候補遺伝子として確認された。

D. 考察

本研究において SMXA RI マウスの親系統である SM/J 系および A/J 系を用いて methamphetamine 誘発報酬効果を検討した結果、A/J 系においては methamphetamine 処置により有意な報酬効果が発現した。しかしながら、SM/J 系マウスにおいては有意な報酬効果も嫌悪効果も認められず、両系統間において著明な系統差が認められた。また、自発運動促進作用およびその逆耐性形成においても A/J および SM/J 系マウスの両系統間において著明な系統差が認められた。近交系動物は遺伝的に均一であるため、この methamphetamine 誘発数種薬理作用における系統差は遺伝的な差に起因していると考えられる。

次に 26 系統の SMXA RI マウスを用いて同様の検討を行った。その結果、methamphetamine により誘発される薬理作用はいずれもほぼ連続的な分布を示した。RI においてはほぼすべての遺伝子が親系統のどちら

かに由来するものであり、親の系統間で異なる形質が仮に単一の遺伝子で支配されている場合、RI 系間においてその形質を調べると、由来している親系統のどちらかに類似した性質のみが現れ、いわゆる二極性の分布を示すことが知られている。しかし、もしその形質が複数の遺伝子により支配されている場合には、その組み合わせにより様々な強度が生じるため、RI 系間についてその形質を調べると連続的な結果が得られる。したがって、SMXA RI マウスにおいて連続的な分布を示した methamphetamine 誘発報酬効果、自発運動促進作用およびその逆耐性形成には複数の遺伝因子が関与していると考えられる。

これらの結果をもとに遺伝解析を行った。一般に interval mapping では 1 つの染色体上に 1 つの候補遺伝子座が存在すると仮定して行われるので、1 つの染色体上に 2 つ以上の候補遺伝子座が存在すると正確な解析ができなくなる。その結果、本来候補遺伝子座が存在しないのに検出される type-1 error および逆の候補遺伝子座が存在しているのに検出されない type-2 error が生じることがある (14, 15)。一般に、薬理遺伝学における解析では type-1 error よりも type-2 error が重要視されることが多いため、基準値 -2 の LRS 値を示した遺伝子座まで採用される。したがって、今回の解析においても基準値 -2 の LRS 値を示した遺伝子座まで採用した。その結果、methamphetamine 誘発報酬効果発現に第 2 染色体上の

D2Mit28、第 17 染色体上の D17Mit68、第 18 染色体上の NaSM30、第 19 染色体上の NaA61 および D19Mit46 遺伝子座の関与が示唆された。これらの関与が示唆された遺伝子座の付近にはそれぞれ phospholipase C β 1、 β 3 および β 4 の遺伝子が存在することが明らかとなっている。また、methamphetamine 誘発自発運動促進作用発現には第 10 染色体上の NaA208、第 11 染色体上の D11Mit214 および D11Mit12 遺伝子座の関与が示唆された。これらの結果から、methamphetamine 誘発自発運動促進作用発現にはこれらの遺伝子座の付近に存在する NMDA receptor NR2C subunit の遺伝子が候補遺伝子として確認された。また、methamphetamine 誘発自発運動促進作用の逆耐性形成には第 3 染色体上の NaSM89 および NaA93 遺伝子座の関与が示唆された。これらの遺伝子座上には phosphoinositide 3-kinase および phospholipase D の遺伝子が存在することが確認された。今回の解析の結果、関与が示唆された遺伝子座上に存在する遺伝子は methamphetamine 誘発数種薬理作用発現に関与する候補遺伝子であると推定できる。したがって、次にこれらの候補遺伝子由来タンパク質の methamphetamine 誘発報酬効果発現における役割について詳細な検討を行うことで、methamphetamine 誘発報酬効果に関与する候補遺伝子由来タンパク質を同定することが可能と考えられる。

[参考文献]

1. Crabbe JC and Belknap JK: Pharmacogenetic tool in the study of drug tolerance and dependence. *Substance Alcohol Action / Misuse* **1**, 385-413 (1980)
2. 鈴木 勉: アルコール耐性、依存の獲得と依存. *アルコール依存とアディクション* **9**, 106-112 (1992)
3. Grahame NJ and Cunningham CL: Genetic difference in intravenous cocaine self-administration between C57BL/6J and DBA/2J mice. *Psychopharmacology* **122**, 281-291 (1995)
4. Kitahara K and Valatx JL: Strain differences in amphetamine sensitivity in mice. *Psychopharmacology* **66**, 189-194 (1979)
5. Gora-Masalak G, McClearn GE, Crabbe JC, Phillips TJ, Belknap JK and Plomin R: Use of recombinant inbred strains to identify quantitative trait loci in psychopharmacology. *Psychopharmacology* **104**, 413-424 (1991)
6. Phillips TJ, Lessov CN, Harland RD and Mitchell SR: Evaluation of potential genetic associations between ethanol tolerance and sensitization in BXD/Ty recombinant inbred mice. *J Pharmacol Exp Ther*

- 277, 613-623 (1996)
7. Phillips TJ, Huson MG and McKinnon CS: Localization of genes mediating acute and sensitized locomotor responses to cocaine in BXD/Ty recombinant inbred mice. *J Neurosci* **18**, 3023-3034 (1998)
 8. Nishimura M, Hirayama N, Serikawa T, Kanehira K, Matsushima Y, Katoh H, Wakana S, Kojima A and Hiai H: The SMXA: A new set of recombinant inbred strain of mice consisting of 26 substrains and their genetic profile. *Mamm Genome* **6**, 850-857 (1995)
 9. Goto N, Yamaoka A, Sudo T, Mannen H, Fukuta K and Nishimura M: Morphometric profiles of the mandible of SMXA recombinant inbred strains of mice and strain identification on the basis of mandible measurements. *Exp Anim* **42**,41-50 (1993)
 10. Manly KF: Users Manual for Map Manager Classic and Map Manager QT. URL: <http://mcbio.med.buffalo.edu/MMM/MMM.html> (1998)
 11. Manly KF and Olsen JM: Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mamm Genome* **10**, 327-334 (1999)
 12. Jansen RC: Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* **135**, 205-211 (1993)
 13. Kruglyak L and Lander ES: A nonparametric approach for mapping quantitative trait loci. *Genetics* **139**, 1421-1428 (1995)
 14. Belknap JK, Mitchell SR, O'Toole LA, Helms ML and Crabbe JC: Type I and type II error rates for quantitative trait loci (QTL) mapping studies using recombinant inbred mouse strains. *Behav Genet* **26**, 149-160 (1996)
 15. Jansen RC: Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. *Genetics* **138**, 871-881 (1994)

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)
分担研究報告書

分担研究課題：モルヒネ依存形成に関わる遺伝子発現の研究

分担研究者：三木直正

研究協力者：郭 哲輝

大阪大学大学院医学系研究科情報薬理

研究要旨

モルヒネ反復使用が痛みに対し耐性を形成すること、また精神的・肉体的依存を形成すること、などは周知の事実であるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。我々は、モルヒネの作用を、セカンドメッセンジャーであるcAMPとの関係を遺伝子発現からの観点から検討を行い、1)神経細胞株のNG-108-15 やマウスをモルヒネ処理すると、これら核抽出物と一本鎖CRE DNA との結合活性が低下すること、2)一本鎖CRE DNA 結合蛋白が、Pur α であること、3)Pur α のDNA への結合を増強する内在性因子がカルモデュリン (CaM)であること、などを報告してきた。本年度は、PC12 細胞を用い、1)モルヒネのCaM遺伝子発現に対する作用、2)強制発現させたPur α の遺伝子発現に対する作用などを検討した。

PC12 細胞をモルヒネ処理すると、 μ 受容体を介してCaM mRNA とCaM蛋白量を増加させた。CaM遺伝子発現を調べると、モルヒネは、CaM III 遺伝子発現を促進させが、CaM I、CaM II 遺伝子発現には影響しなかった。

Pur α を強制発現させたPC12 細胞は、神経突起伸展を引き起こすNerve growth factor (NGF) やフォルスコリン存在下で培養しても、その突起伸展が著明に抑制された。また、CRE-レポーター遺伝子発現活性も抑制された。これら実験過程で、強制発現させたPur α が細胞質にも多量に分布している事に気がついたので、マウス脳Pur α の分布を細胞下分画で検討したところ可溶性分画とマイクロソーム分画にPur α 含有量が多いことがわかった。

これらの結果から、モルヒネは細胞内カルシウムセンサーであるCaMの遺伝子発現に、また、Pur α はCRE配列を持つ遺伝子の転写活性に作用し、その遺伝子発現を調節する可能性が考えられた。

A. 研究目的

我々は、一本鎖CRE 配列を持つDNAへの結合活性がモルヒネ処理で減少すること(1,2)、結合蛋白がPur α であることを見いだした(3)。また、Pur α の一本鎖CRE DNAへの結合を増強する因子がCaM であることも同定した(4)。モルヒネの鎮痛作用がカルシウムで拮抗されること(5)、カルシウム結合蛋白であり、また細胞内カルシウムセンサーであるCaMがPur α のDNA結合を増強することから、モルヒネとCaM 遺伝子発現との関係をPC12 細胞で調べた。Pur α は、複製や転写活性に関与する核蛋白でその結合エレメントはPURと呼ばれている。本蛋白の生理機能には不明な点が多い。我々は、Pur α 蛋白が他の組織に比べ脳で多量に発現されている事も見いだしている(3)。神経系におけるPur α の機能的役割を検討するため、神経細胞株であるPC12 細胞にPur α を強制発現させソマトスタチン CRE - ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とし、その活性を調べることで転写活性に対する作用を検討した。

B. 方法

B-1. CaM 遺伝子発現

モルヒネなど薬物処理したPC12 細胞からtotal RNA 及び蛋白(膜・可溶性分画)を調整し、RT-PCR 及びウエスタンブロットを行った。PCR産物中のCaM mRNA 量は、アガロースゲルで分離後 β -actin mRNA との量比を調べた。CaM 遺伝子発現は、薬物処理PC12 細胞のtotal RNAとのノーザンブロットを行い、CaM I、CaM II、CaM III に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションから検討した。

B-2. 転写活性に対するPur α の作用

pcDNA 3.1 (+) 発現ベクターに全長Pur α cDNA を入れたプラスミドを作製した。レポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ発現ベクター(pGL3-promoter) にソマトスタチンCRE 遺伝子を入れたプラスミド(pGL3-CRE) を作製した。内部標準にはpRL-TKベクターを用いた。共発現させPC12 細胞をNerve growth factor やフォルスコリンで処理後、Promega

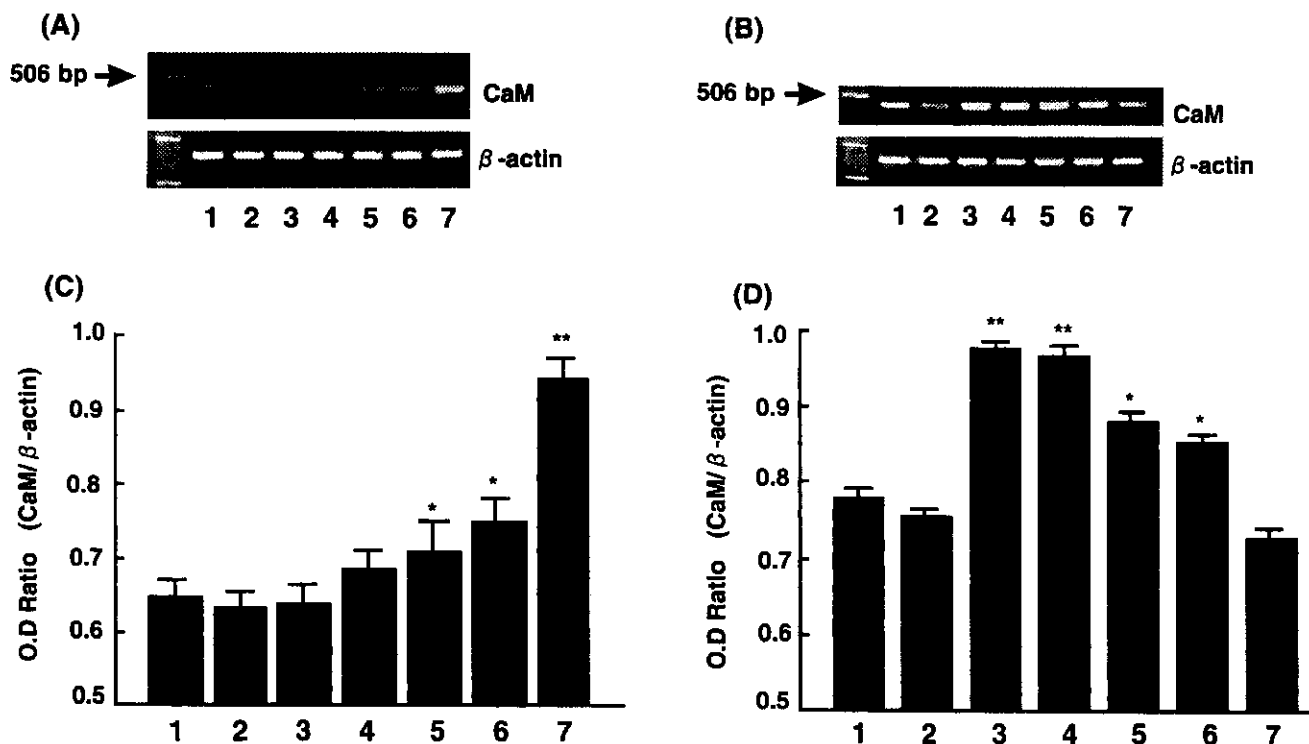


Fig. 1. Effects of morphine on CaM mRNA levels in PC12 cell. PC12 cells were treated with various concentrations of morphine or naloxone, and then CaM mRNA levels were detected by the RT-PCR as described in the Materials and Methods. A and C: time course of CaM expression by morphine treatment (1: Control; 2: Naloxone, 48 h; 3: Morphine and naloxone, 48 h; 4: Morphine, 1 h; 5: Morphine, 4 h; 6: Morphine, 24 h; 7: Morphine, 48 h). B and D: dose-dependent expression of CaM by morphine (1: Control; 2: Morphine, 10^{-5} M and naloxone, 10^{-5} M; 3: Morphine, 10^{-4} M; 4: Morphine, 10^{-5} M; 5: Morphine, 10^{-6} M; 6: Morphine, 10^{-7} M; 7: Morphine, 10^{-8} M). A and B: ethidium bromide staining of RT-PCR products that correspond to the CaM and β -actin mRNAs. C and D: quantification of the DNA bands corresponding to the CaM mRNA. Data are expressed as the ratio of CaM mRNA / β -actin mRNA in each treatment group. The results are represented as the mean \pm S.E.M. from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

社の dual luciferase reporter gene assay system を用いルシフェラーゼ活性を測定した。

B-3. マウス全脳細胞の細胞下分画

マウス脳を0.32M sucrose でホモゲナイズし、斉藤らの方法に従い細胞下分画を行った(6)。

C. 結果

C-1. モルヒネによるカルモデュリン遺伝子発現の調節

モルヒネの鎮痛作用がカルシウムで拮抗されること、CaMがPur α のDNA結合を増強することから、モルヒネとの関係をPC12細胞で調べた。モルヒネと μ アゴニストであるDAMGOは、CaM mRNAと蛋白量を増加させたが、 δ や κ アゴニストであるDPDPEやU50,488は無影響であった。Fig. 1にモルヒネなど種々の薬物のCaM mRNA量に対する時間経過と用量依存作用の結果を示した。CaM蛋白は、膜と可溶性の両分画で増

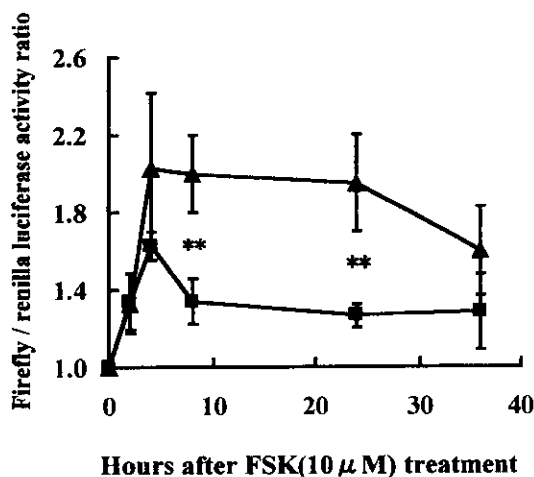
加していた。現在、CaMの遺伝子は、I、IIとIIIが知られているが、モルヒネは、CaM III遺伝子発現のみを促進させることがノーザンブロットから明らかになった。モルヒネの作用は拮抗薬のナロキソンで消失することから、受容体を介した現象と考えられる(7)。

最近、オピオイド受容体の細胞内第3ループにCaMが結合していること、アゴニスト刺激で結合CaMが遊離し核へ移行すること、などが報告(8)されており、これらとの関係に興味を持たれる。

C-2. Pur α によるソマトスタチンCRE転写活性と神経突起伸展活性の抑制

Pur α は、末梢組織で見いだされた蛋白質であるが、我々がウエスタンなどで組織分布を調べると、末梢組織に比べ脳での含量は約10倍も高い値を示すことから、Pur α が神経活動に深く関わっていると考えている。最近、いくつかの神経特異的遺伝子上流にPur α が結合し、転写活性に影響を与えることが報告されている。我々も、PC12細胞にPur α を強制発現させ、その作用を検討し

A



B

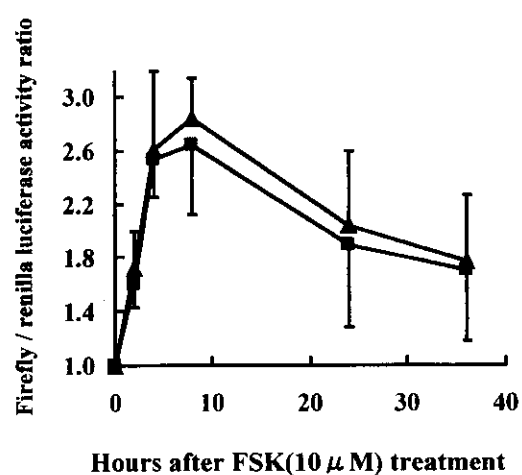


Fig. 2. Effects of Pur α on CRE enhancer activity. (A) To make the pGL3-CRE construct, ssSOM-CRE was annealed with its complementary oligonucleotides and inserted to the pGL3-promoter plasmid. pcDNA3.1(+) (closed triangles) or pcDNA3.1(+)-Pur α (closed squares) were co-transfected with pGL3-CRE and pRL-TK (internal control). The promoter activities of pGL3-CRE were assayed by measuring its ability to drive firefly-luciferase expression after 10 μ M forskolin (FSK) treatment. Each value was represented as a relative luciferase activity by taking a ratio with renilla/luciferase activities and mean \pm S.D. from the three experiments. ** $P < 0.01$. (B) To create the pGL3-CRE(Δ PUR) construct, ssCRE(Δ PUR) was annealed with its complementary oligonucleotides and inserted into pGL3-promoter plasmid. pcDNA3.1(+) (closed triangles) or pcDNA3.1(+)-Pur α (closed squares) were co-transfected with pGL3-CRE(Δ PUR) and pRL-TK. The promoter activities of pGL3-CRE(Δ PUR) were assayed after 10 μ M forskolin (FSK) treatment. Each value was represented as a relative luciferase and mean \pm S.D. from the three experiments.

た。神経突起伸展を引き起こす Nerve growth factor や cAMP の生成を高めるフォルスコリン処理をしても、Pur α を強制発現させた PC12 細胞からの突起伸展は著明に抑制されることを認めた。また、CRE-ポーター遺伝子発現の抑制も見いだした (Fig. 2)。これらの結果は、(GGN)_n 配列を認識すると考えられている Pur α の生理的役割の一つには、CRE に近接した (GGN)_n 配列上で CREB との相互作用により、転写活性を調節している可能性を示唆する (9)。同様な配列を持つ遺伝子には、プロエンケファリンや Tyrosine hydroxylase などを考えている。

C-3. Pur α の細胞内分布

Pur α を強制発現させ、PC12 細胞での Pur α 蛋白の分布を免疫組織化学を行うと、細胞質に多量の Pur α が局在していることに気がついたので、マウス全脳を細胞下分画し、Pur α の分布をウエスタンで検討した。mg 蛋白あたりの Pur α 量 (比活性) は、核抽出分画では高い値を示すが、各分画中の全 Pur α 量を見ると可溶性分画とマイクロソーム分画に多量存在することがわかった。これらの結果は、Pur α の生理作用が核内 (複製・転写活性の調節) だけでなく、核外においても何らかの機能を持っている可能性を示唆している。

D. 考察

我々は、モルヒネ反復処理でマウス小脳や NG-108-15 細胞から調整した核抽出物が一本鎖 CRE DNA との結合活性が低下すること、ソマトスタチン一本鎖 CRE DNA 結合蛋白が Pur α であることを明らかにした。末梢組織から見いだされた Pur α 蛋白は、複製に関与する核蛋白質として最初報告されたが、転写活性にも関与する調節蛋白であることが Fig. 2 でも明らかである。ターゲット遺伝子には、CRE に近接した (GGN)_n 配列上で CREB と Pur α の相互作用が可能なプロエンケファリンや Tyrosine Hydroxylase などとも考えているが、その同定は重要課題と考えている。モルヒネの鎮痛作用がカルシウムで拮抗されること、CaM が Pur α の DNA 結合を増強すること、オピオイド受容体に CaM が結合している \rightarrow アゴニスト刺激で結合 CaM が遊離し \rightarrow 核

へ移行し \rightarrow CREB のリン酸化 \rightarrow 転写活性の調節が行われること、などを考えるとモルヒネ μ 受容体を介した CaM III 遺伝子発現の促進など (Fig. 1) は、モルヒネ耐性・依存形成過程での Pur α の生理作用とカップルしているのかも知れない。CaM III 遺伝子上流には PUR が局在しており、Pur α との相互作用にも興味を持たれる。他方、Pur α が細胞質にも多量分布していることを考えると、RNA との相互作用などの考慮も必要となってくる。現在、Pur α が多量存在している海馬や小脳に注目し、モルヒネの作用を検討している。

引用文献

- 1) Osugi T, et al : Effects of chronic exposure of NG108-15 cells to morphine or ethanol on binding of nuclear factors to cAMP-response element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174 : 25 - 31, 1991.
- 2) Osugi T, et al : Modulation by chronic morphine administration of single-stranded cAMP response element (ssCRE) binding proteins in the mouse cerebellum. *Mol. Brain Res.* 21: 256-262, 1994
- 3) Osugi T, et al : Involvement of a single-stranded DNA binding protein, ssCRE-BP/Pur α , in morphine dependence. *FEBS lett.* 391:11 - 16, 1996.
- 4) Kuo C-H, et al. : Calmodulin functions as an activator of Pur α binding to single-stranded purine-rich DNA elements (PUR elements). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255 : 406 - 411, 1999
- 5) Hano K, et al : Significance of Ca⁺⁺ ion in the morphine analgesia. *Jpn. J. Pharmacol.* 14 : 227 - 229, 1964
- 6) Saito K, et al : Calcium binding of isolated synaptic membranes from rat cerebral cortex. *Jpn. J. Pharmacol.*, 22 : 787 - 798, 2000
- 7) Niu S-Y, et al. : Incalmodulin III gene expression by μ -opioid receptor stimulation in PC12 cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, 84 : 412 - 417, 2000
- 8) Wang D, et al.: Nuclear Ca⁺⁺/calmodulin translocation activated by μ -opioid (OP3) receptor. *J. Neurochem.* 74 : 1418 - 1425,