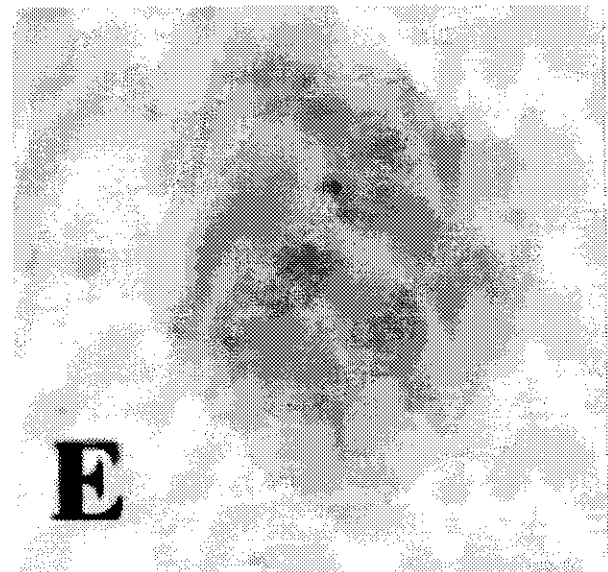
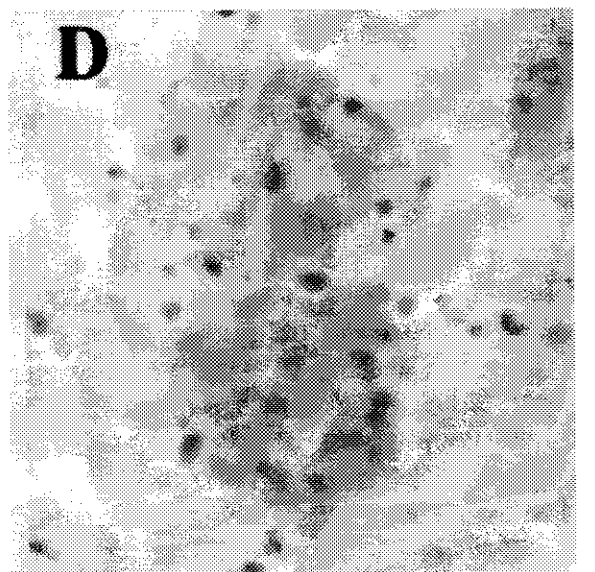
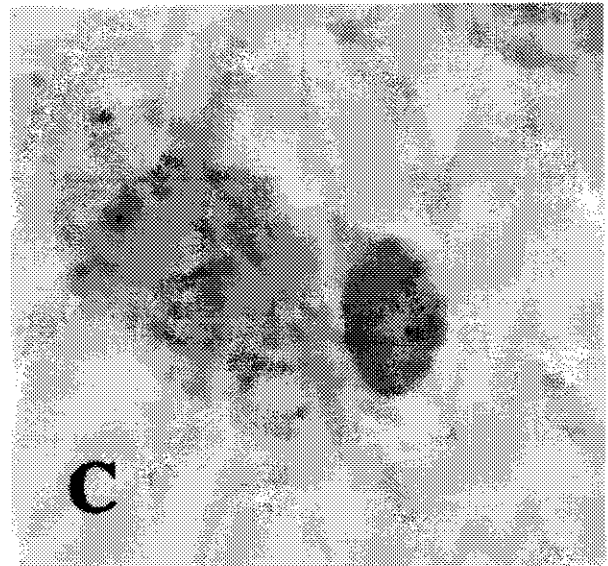
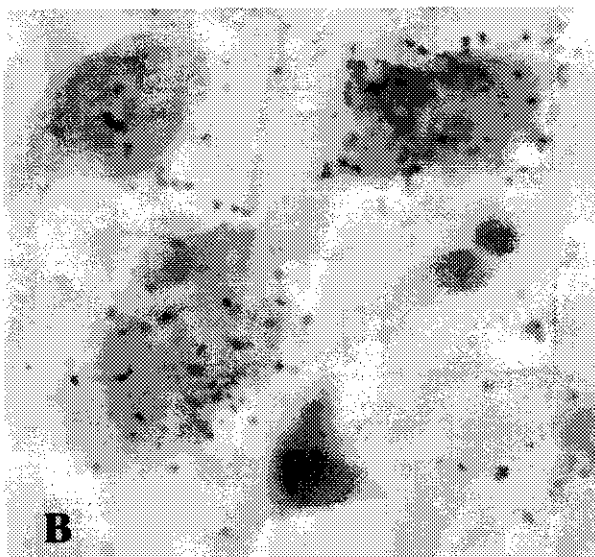


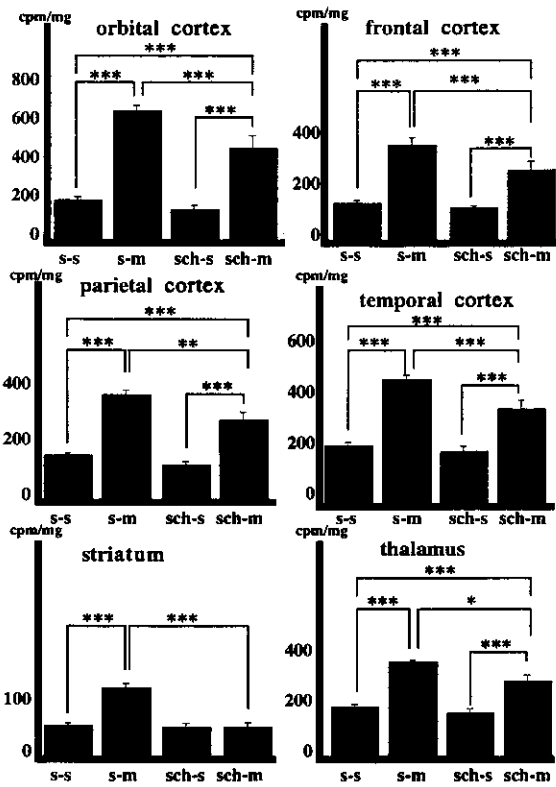
Fig. 3 フィルムオートラジオグラフィーを同一切片 Nissl 染色に合成 (A)。MKP-1 mRNA は頭頂葉皮質第 IV 層と第 VI 層に一致して存在。4mg/kg METH(B,D)あるいは生食投与後(C,E)のマイクロオートラジオグラフィー。MKP-1 mRNA(B,C)、MKP-3 mRNA(D,E)。



発現に対する効果を示す。F3,24=21.788,  $p=0.0001$ ; 眼窩回皮質、F3,24=12.432,  $p=0.0001$ ; 前頭葉、F3,24=13.511,  $p=0.0001$ ; 側頭葉、F3,24=21.178,

$p=0.0001$ ; 頭頂葉、F3,24=3.464,  $p=0.0320$ ; 線条体、で有意差が見られた(Fig. 5B)。海馬 CA1、海馬 CA3、後頭葉では MK-801 前投与による発現の抑

### A. MKP-1 mRNA



### B. MKP-3 mRNA

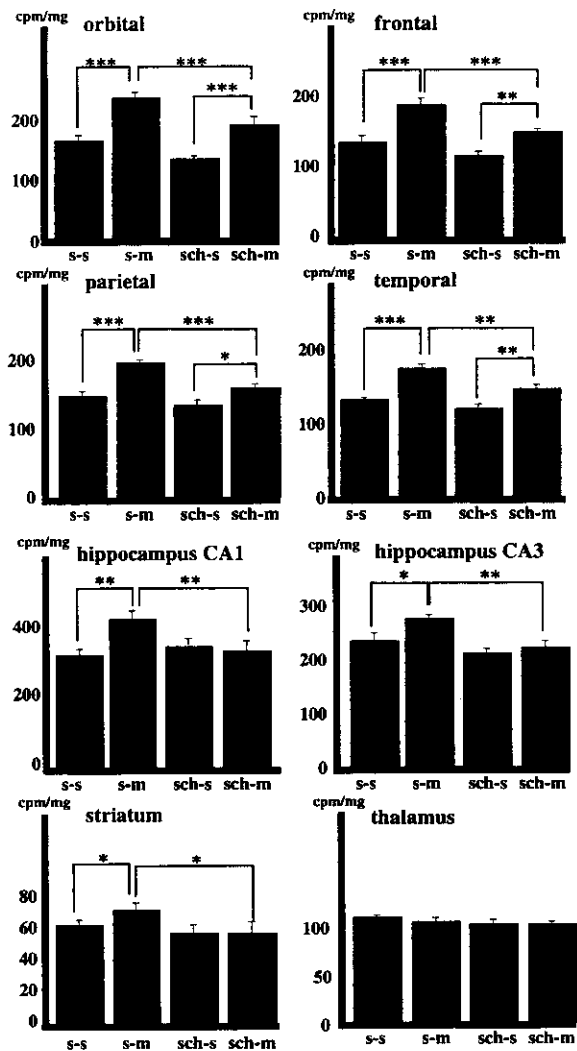


Fig. 4 SCH 23390 (0.5mg/kg) 前投与の MKP-1 (A)、MKP-3 (B) mRNA 発現に対する効果の定量結果。生食あるいは SCH 23390 (0.5mg/kg) 前投与後 30 分、生食あるいは METH (4mg/kg) 投与。その後 1 時間で断頭 (n=6 あるいは 8)。各数値は平均 ± 標準誤差で表示。\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001。

制は見られなかった。MK-801 前投与のみ (MK-SAL 群) では生食投与 (SAL-SAL 群) との差はなかった。

#### 4. METH 慢性投与の影響

MKP-1 mRNA の、METH 10 日間慢性投与による効果を Fig. 6A に示す。線状体をのぞいて、急性投与と同じ部位で発現増加が見られた。F2,21=28.438, p=0.0001; 眼窩回皮質、F2,22=23.163, p=0.0001; 前頭葉、F2,22=24.865, p=0.0001; 側頭葉、F2,22=20.526, p=0.0001; 頭頂葉、F2,22=13.730, p=0.0001; 後頭葉、F2,22=10.133, p=0.0008; 視床で METH 慢性投与 1 時間後断頭群で SAL 慢性投与 1 時間後断頭群に比べ発現増加し、24 時間後断頭群では定常状態にもどっていた。

MKP-3 mRNA の、METH 10 日間慢性投与による効果を Fig. 6B に示す。F2,22=18.991, p=0.0001; 海馬 CA1 においてのみ、METH 慢性投与 1 時間後

断頭群で SAL 慢性投与 1 時間後断頭群に比べ発現増加し、24 時間後断頭群では定常状態にもどっていた。一方、そのほかの部位では、増加は見られなかった。

#### 5. Western blot

蛋白発現量を比較すると大脳皮質において SAL 投与後 3h 群では明らかなシグナルは見られなかったが、METH 投与後 3h 群では 38kDa の部位に発現が見られた (Fig. 7A)。一方、この変化は海馬では見られなかった。そして、このバンドは、blocking peptide によって、発現抑制され特異性が示された (Fig. 7B)。

#### D. 考察

我々は、今回の研究で、METH の急性投与がラット大脳皮質、線状体、視床において MKP-1 mRNA の発現を、大脳皮質、線状体、海馬におい

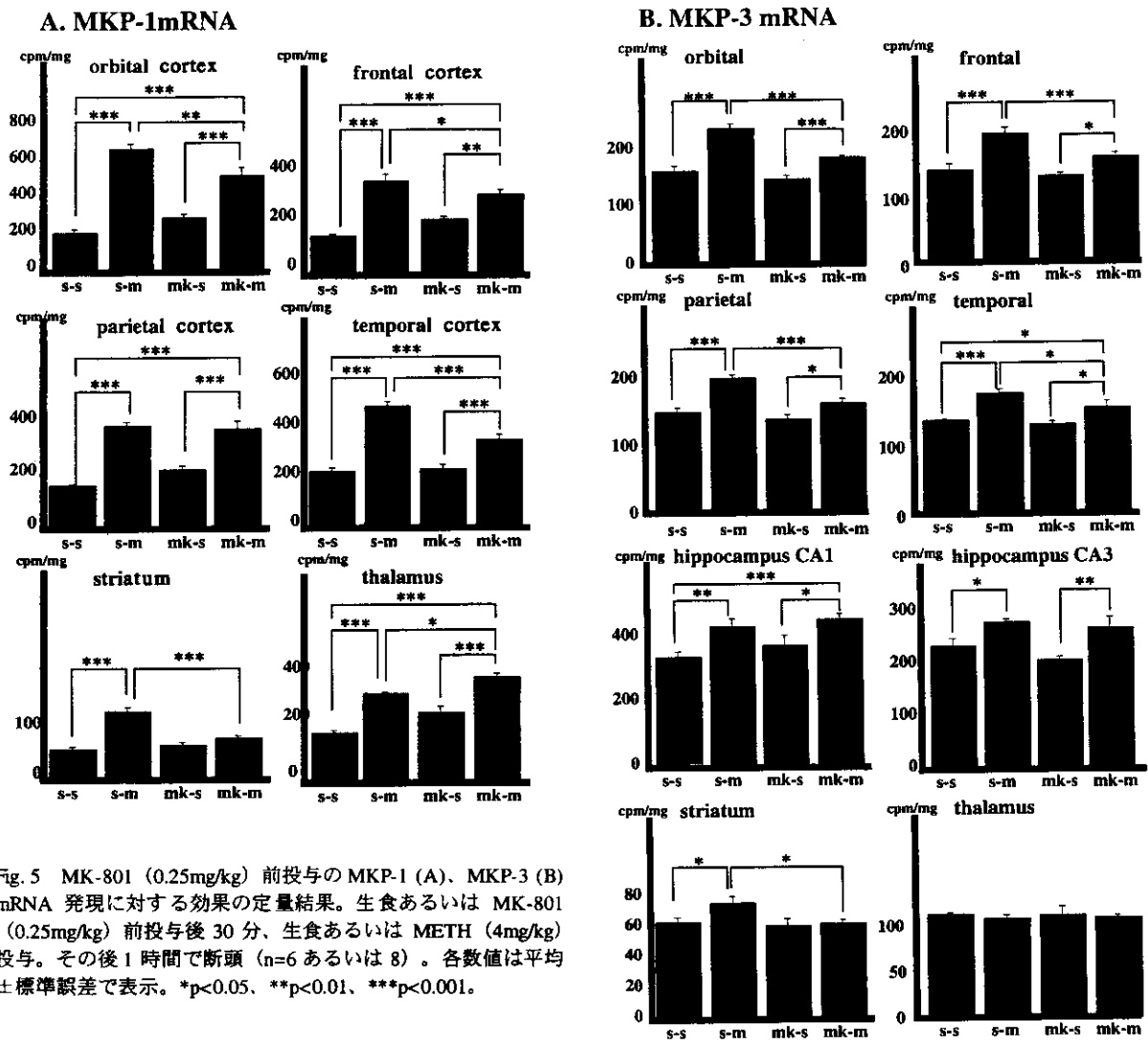


Fig. 5 MK-801 (0.25mg/kg) 前投与のMKP-1 (A), MKP-3 (B) mRNA 発現に対する効果の定量結果。生食あるいは MK-801 (0.25mg/kg) 前投与後 30 分、生食あるいは METH (4mg/kg) 投与。その後 1 時間で断頭 (n=6 あるいは 8)。各数値は平均 ± 標準誤差で表示。\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001。

ては MKP-3 mRNA の発現を著明に増強することを初めて示した。MKP ファミリーは、細胞成長、分化、アポトーシス、転写などを含む様々な可塑性変化に関与している MAP キナーゼファミリーと深く関係している事が広く知られている<sup>1) 2) 3) 5) 6)</sup>。MKP ファミリーは、MAP キナーゼファミリーに対して脱リン酸化し不活性化することで negative feedback として機能するだけでなく、MAP キナーゼファミリーが直接 MKP ファミリーの機能そのものを活性化することも報告されている<sup>3) 5) 6)</sup> (Fig. 8)。神経刺激物質投与による逆耐性現象における MAP キナーゼの役割については、コカインの反復投与で、NMDA 受容体依存性に VTA で extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が活性化するという報告<sup>1)</sup>、神経成長因子の Neurotrophin-3 がコカインによる逆耐性現象の導入に ERK の活性化を通じて関与しているという報告<sup>10)</sup>があり、また、神経刺激物質投与による MKP の発現に関して

MKP-3 と同様に、古典的 MAPK を脱リン酸化する dual-specificity phosphatase (DUSP)-8 が、コカイン単回投与後に、側坐核、線状体、海馬で、発現が増加しているという報告<sup>13)</sup>、コカイン単回投与により MKP-1 mRNA が線状体、大脳皮質において 1h 後に発現増加するという報告<sup>2)</sup>があるのみである。今回の研究で、METH 投与においても MKP ファミリーが重要な役割を果たしていることが示され、間接的ではあるが MAP キナーゼの活性化が生じていることが推定された。

また、MKP ファミリーと MAP キナーゼファミリーの結合能により、MKP ファミリーには基質特異性に差が見られており、MKP-1 はどの MAP キナーゼファミリー分子 (ERK、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38MAPK) も不活性化するのに対し、MKP-3 は古典的 MAP キナーゼ (ERK) のみ不活性化することが知られている<sup>9)</sup>。この度の報告で、大脳皮質、線状体においては MKP-1、MKP-3 mRNA

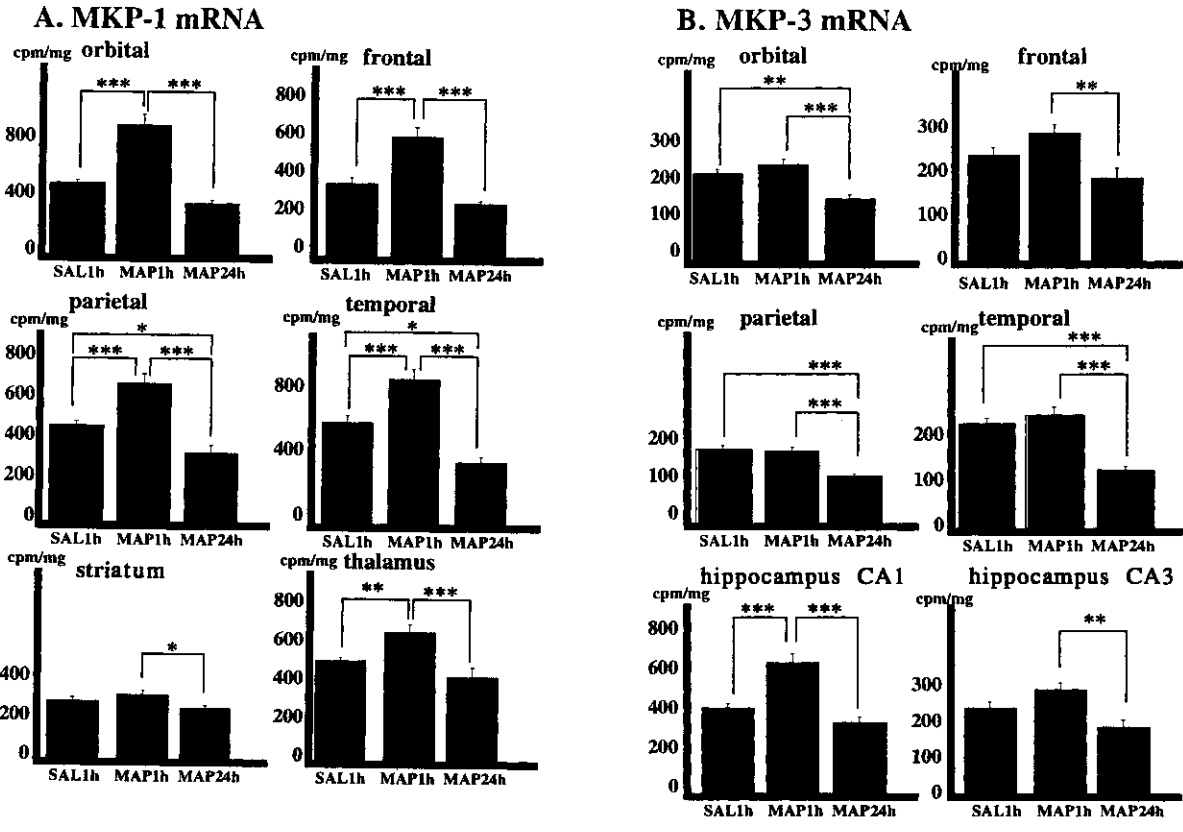


Fig. 6 METH 10日間慢性投与によるMKP-1 (A)、MKP-3 (B) mRNA の効果。METH 慢性投与1時間後断頭群、SAL 慢性投与1時間後断頭群、METH 慢性投与24時間後断頭群の3群。  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。

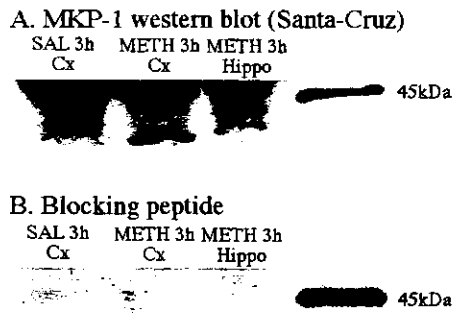


Fig.7 Western blotによるMETH投与後3h群とSAL投与3h群のMKP-1蛋白変化。大脳皮質において38kDaの部位に発現が見られた(A)。特異的なblocking peptideによって発現抑制された(B)。

両者が発現増加しているのに対して、視床においてはMKP-1mRNAのみが、海馬のCA1、CA3領域にはMKP-3 mRNAのみが発現増加しており、先のDUSP-8に関する報告も含めラットの各脳部位でMKPファミリーで特異的に発現する部位が異なっていることが示された。

薬理的検討には、これまでにMETHによる逆耐性現象形成を阻止することの知られている2種類の薬剤、SCH23390 (ドパミンD<sub>1</sub>受容体遮断薬)<sup>14)</sup>とMK-801 (非競合的NMDA受容体遮断薬)<sup>7)</sup>を用いた。逆耐性現象におけるMKP-1 mRNAの発現はD<sub>1</sub>、NMDA受容体を介して発現し、一方、MKP-3 mRNAの発現はD<sub>1</sub>、NMDA受容体をおおむね介しているが、海馬においてはD<sub>1</sub>受容体のみが関与していることが示された。

前頭葉におけるD<sub>1</sub>受容体の分布はよく知られている。D<sub>1</sub>受容体は第VI層に主に分布し、それはmesocorticalなドーパミンニューロンの投射先に一致する。D<sub>1</sub>受容体を持つニューロンの詳細な検討によると、そのいくつかは錐体細胞とシナプスを持つ非錐体細胞である<sup>15)</sup>。本研究で大脳皮質のMKP-1 mRNAの分布は第IV層と第VI層に存在することが分かった。従って、前頭葉でのドーパミン放出を増加させるMETH急性投与によって、直

|                   | acute       |            | chronic    |            |
|-------------------|-------------|------------|------------|------------|
|                   | MKP-1       | MKP-3      | MKP-1      | MKP-3      |
| orbital cortex    | 301.21% *** | 50.35% *** | 59.86% *** | 12.27%     |
| prefrontal cortex | 194.61% *** | 45.35% *** | 67.09% *** | 20.48%     |
| parietal cortex   | 129.23% *** | 46.44% *** | 43.57% *** | -4.80%     |
| temporal cortex   | 146.52% *** | 41.74% *** | 42.56% **  | 41.74%     |
| thalamus          | 88.48% **   | 10.39%     | 27.51% **  | 10.39%     |
| striatum          | 63.48% **   | 11.21% **  | 11.63% *** | 11.21%     |
| hippocampus CA1   | 発現なし        | 38.16% *** | 発現なし       | 50.00% *** |
| hippocampus CA3   | 発現なし        | 34.26% *** | 発現なし       | 20.48%     |

Table 1 急性投与、慢性投与の結果のまとめ。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。

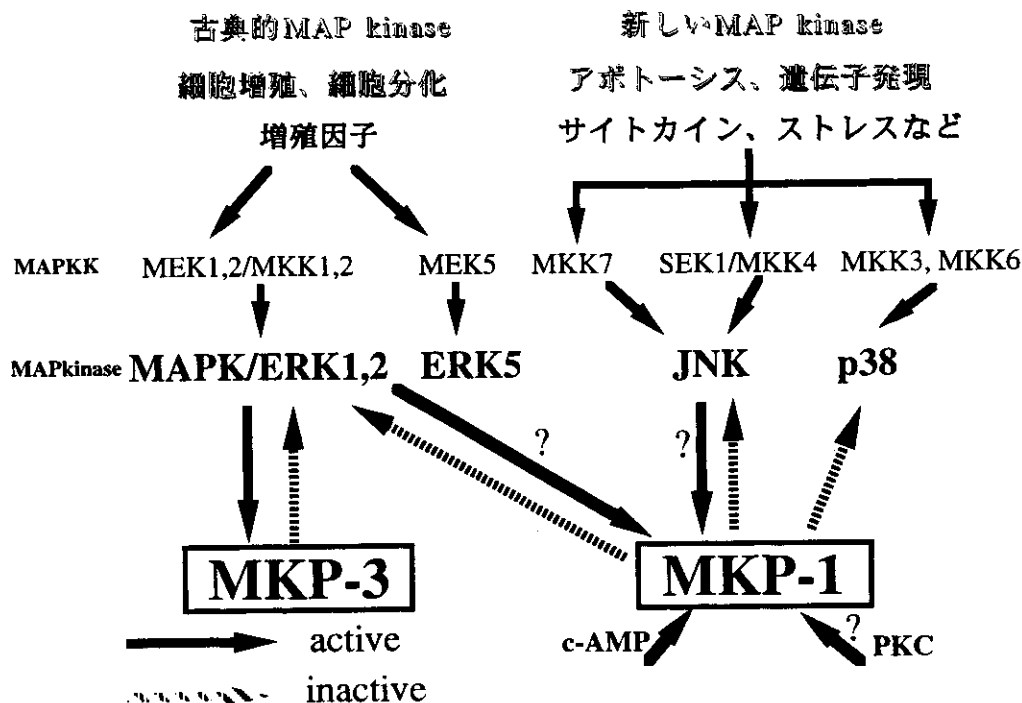


Fig.8 MAPK ファミリーとMKPファミリーの関係を図にまとめたもの

接  $D_1$  受容体依存性に、大脳皮質での MKP-1、MKP-3 mRNA 発現が増強されると考えられる。

METH 慢性投与実験では、MKP-1 mRNA が、線状体をのぞく急性投与にて発現が増加していた部位において、発現が増加していたのに対し、MKP-3 mRNA は、METH 急性投与にて発現が増加していたほとんどの部位で発現が増加せず海馬 CA1 でのみ発現が増加していた。今回の慢性投与実験は、METH4mg/kg を 1 日 1 回 10 日間、というスケジュールで行ったが、常同行動を指標とした逆耐性現象が、投与 3~5 日目という比較的早くに完成する<sup>15)</sup>。逆耐性現象の形成には形成期(induction process)と維持期(maintenance process)よりなり、それらに参与している遺伝子は異なっていると考えられる。我々が先に報告した Arc mRNA が形成期

と維持期の両方に関与し<sup>8)</sup>、synaptophysin、stathmin は形成期のみに関与していることを報告した<sup>12)</sup>。大脳皮質、線条体、視床の MKP-1 は形成期、維持期のみに関与し、大脳皮質、線条体、海馬の MKP-3 は形成期に関与し、維持期においては海馬 CA1 の MKP-3 のみ関与していることが示された。今回の結果は、昨年、一昨年の結果と同様に逆耐性の形成期と維持期ではその分子化学的機序が異なっていることを示すものと考えられる。今後、他の可塑性関連分子も検討し、そのより詳細な機序を解明していく必要があると考えられた。

## E. 結論

METH 急性投与により、大脳皮質、視床、線状体において MKP-1 の活性化、大脳皮質、線状体、海馬においては MKP-3 の活性化が示された。これらの多くは、D<sub>1</sub> 受容体及び NMDA 受容体依存性の活性化であることから METH 逆耐性現象に関わる変化であることが確認された。これら MKP 分子の変化は、MAP キナーゼファミリーの機能変化の現れと考えられることから、METH 逆耐性現象における MAP キナーゼカスケードが、脳部位別に、加えて逆耐性の形成期と維持期別に異なった制御を受けていることが示された。

### [参考文献]

- 1) Berhow M.T., Hiroi N., Nestler E.J.: Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine. *J. Neurosci.*, 16: 4707-4715, 1996.
- 2) Berke J.D., Paletzki R.F., Aronson G.J., et al.: A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J. Neurosci.*, 18: 5301-5310, 1998.
- 3) Bokemeyer D., Sorokin A., Yan M. et al.: Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress-activated protein kinase signaling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 271: 639-642, 1996.
- 4) Boschert U., Dickinson R., Muda M. et al.: Regulated expression of dual specificity protein phosphatases in rat brain. *Neuroreport*, 9: 4081-4086, 1998.
- 5) Camps M., Nichols A., Gillieron C. et al.: Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science*, 280: 1262-1265, 1998.
- 6) Franklin C. C., Kraft A.S.: Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J. Biol. Chem.*, 272: 16917-16923, 1997.
- 7) Karler R., Calder L.D., Chaudhry L.A.: Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci.*, 45:599-606, 1989.
- 8) Kodama M., Akiyama K., Ujike H. et al.: A robust increase in expression of *arc* gene, an effector immediate early gene, in the rat brain after acute and chronic methamphetamine administration. *Brain Res.*, 796:273-283, 1998.
- 9) Muda M., Theodosiou A., Rodrigues N. et al.: The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 271: 27205-27208, 1996.
- 10) Pierce R.C., Pierce-Bancroft A.F., Prasad B.M.: Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade. *J. Neurosci.*, 19 :8685-8695, 1999.
- 11) Sato M., Chen C.C., Akiyama K. et al.: Acute exacerbation of paranoid psychotic state after long-term abstinence in patients with previous methamphetamine psychosis. *Biol. Psychiatry*, 18:429-440, 1983.
- 12) Takaki M., Ujike H., Kodama M. et al.: Increased expression of synaptophysin and stathmin mRNA after methamphetamine administration in rat brain. *Neuroreport*, in press.
- 13) Thiriet N., Humblot N., Burgun C. et al.: Cocaine and fluoxetine induce the expression of the hVH-5 gene encoding a MAP kinase phosphatase. *Mol. Brain Res.*, 62: 150-157, 1998.
- 14) Ujike H., Onoue T., Akiyama K.: Effects of selective D-1 and D-2 dopamine antagonists on development of methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Psychopharmacology*, 98:89-92, 1989.
- 15) Vincent S.L., Khan Y., Benes F.M.: Cellular distribution of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.*, 13:2551-2564, 1993.

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

乱用薬物対策等に関する研究

分担研究課題：乱用薬物による脳機能障害の分子機構の解明

分担研究者 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 部長  
東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野 教授  
研究協力者 梶井 靖、村岡新一郎、海野 麻未、黒田安計、柏 淳

研究要旨

Amphetamine類やコカインによる分裂病類似の精神病状態のモデルである行動感作（逆耐性現象）に関連する候補遺伝子として、昨年度までに、ラット大脳新皮質から、逆耐性が形成され始める生後3週頃からmethamphetamine（MAP）への応答を獲得する新規遺伝子群*mrt1*（MAP responsive transcript 1）、*mrt2*および*mrt3*を同定した。本年度は、主に*mrt1*がコードすることが予測されるPDZ蛋白質に対する抗体を用いた解析を進めた。*mrt1*は大脳新皮質のウェスタンブロット上62kDa付近のバンドとして検出される少なくとも2種類の蛋白質（Mrt1AおよびMrt1B）をコードしていることが示唆された。このうちMAPによって発現誘導が見られるバリエーションにコードされるMrt1Bは、大脳新皮質において、ホモジネートとシナプトゾーム画分に豊富に含まれるが、postsynaptic densityには少ない分布パターンを示し、主として前シナプス側に局在することが推測された。これに対してMAPに反応しないバリエーションの産物であるMrt1Aは、シナプトゾーム画分に免疫反応が認められなかった。逆耐性形成を阻害するanti-*mrt1* oligonucleotideを脳室内注入したラットの線条体では、Mrt1蛋白質の基礎的発現量が低下しMAPによる誘導も抑制された。これらの結果から、Mrt1B蛋白質が脳のシナプスで逆耐性形成に関与する神経可塑性関連分子として機能していることが示唆された。さらに、ヒトにおける病態を検討するため、*mrt1*のヒト相同遺伝子の検索を進めた。

A. 研究目的

本研究は、アンフェタミン類（amphetamine、methamphetamine（MAP）など）、コカイン、フェンサイクリジン（phencyclidine（PCP））等の、精神分裂病（分裂病）様症状を引き起こす乱用薬物による長期的脳機能障害の発生機序を分子レベルで解明し、新しい治療法の標

的となる神経機構や、臨床診断と経過のマーカー物質を見いだすことを目的としている。このため、1)臨床経験的に、amphetamine類や、PCPと同様の異常を発現させるケタミンが、小児期までは依存形成や精神症状を生じさせ難いことが知られている<sup>1,9,10</sup>、2)実験動物においては、これらの薬物による異常行動や脳の活動

常のパターンが生後発達に伴って変化し、一定の時期以降に成熟期のパターンになる<sup>3,6,7,11</sup>、などの点に着目して分子生物学的研究を進めた。すなわち、以上の事実は、分裂病様症状を発現させる乱用薬物によって異常を来す脳内情報処理系は、特定の発達段階以降に成熟して薬物の影響を受けるようになることを示唆している。

そこで、このような情報処理系を構築する分子群を明らかにする目的で、乱用薬物が誘発する行動や脳の活動性の異常が成熟期型のパターンを示す時期より、MAPまたはPCPに対して応答性を獲得する遺伝子群を検索した。その結果、候補として、*mrt1* (MAP responsive transcript 1)、*mrt2*、*mrt3*、*prt1* (phencyclidine-responsive transcript 1)、*prt2*、*prt3*等が検出され、このうち*mrt1*および*prt-1*に関する検討が進み昨年度までに報告してきた<sup>4,5</sup>。今年度は、主に*mrt1*がコードするMrt1蛋白に対する抗体を用いたMrt1蛋白の局在や薬物応答性、および*mrt1*のヒト相同遺伝子の検索を行った。

## B. 研究方法

### (1)対象および薬物

動物実験には、生後56日令のWistar系雄性ラットを用いた。ラットは22.0±0.5℃、湿度55%、8時より20時を明期とする明暗条件下で飼育した。

試薬は、すべて市販のものを用いた。薬物は生理的食塩水に溶解し、皮下(s.c.)あるいは腹腔内(i.p.)に注射した。対照群の動物には注射溶媒を投与した。薬物の投与量は、常にfree baseで計算した。

### (2)抗Mrt1抗体の作製

*mrt1*の塩基配列から、少なくとも2種類の蛋白質(Mrt1AおよびMrt1B)がコードされていることが予想されたため、1)双方の蛋白質に共通、2)Mrt1Aに特異的、あるいは3)Mrt1Bに特異的なアミノ酸配列に対する3種類の抗体を作製した。それぞれに対応するペプチドを合成し、keyhole limpet hemocyaninに結合させた後、ウサギに免疫することにより抗血清を得た。力価の高い抗血清をアフィニティカラムで精製して実験に用いた。

### (3)ウェスタンブロット分析<sup>12)</sup>

ラット大脳新皮質から、0.125% SDS、0.625% sodium deoxycholate、1.25% NP-40、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA と Complete Mini (Roche)を含む緩衝液で蛋白を抽出した。シナプトゾーム画分と後シナプスの構成成分である postsynaptic densityはCarlinら<sup>2)</sup>の方法にしたがって調整した。蛋白は7.5% または10% SDS-PAGEによって分離した後、Immun-Blot polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad)にトランスファーし、種々の蛋白に対する抗体と反応させた。

各画分の調整を確認し、局在の指標とする目的で、前シナプスに存在するSNAP-25 (Transduction Laboratories)およびKv1.4 (Upstate Biotechnology)、後シナプスに分布するPSD-95 (Transduction Laboratories)と、各画分に広く分布するactin (Sigma)に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行った。免疫反応は化学発光法によって検出し、LumiImager chemiluminescence detector (Roche)を用いて定量的に解析した。



#### (4) アンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内注入

翻訳開始コドンを含む *mrt1* に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、生体内での代謝を抑制するためフォスフォロチオエートによって修飾したものを合成した (phosphorothionate型: DNAのリン酸ジエステル結合の酸素分子を一つ硫黄残基に置換修飾)。アンチセンスS-オリゴマーは、浸透圧ミニポンプ (Alzet model 2001, Alza, 7日間注入用:  $1\mu\text{L/h}$ で溶液を放出) を使い、ラットの右側脳室内に7日間にわたって持続的に注入した。注入部位はPaxinosとWatsonの図譜<sup>9)</sup>で、AP, -0.8 mm; V, +2.0; L, +1.5とした。対照群の動物には、同じ塩基組成、塩基数で配列をランダムに並べ替えたミスセンスS-オリゴマーを用いた。

逆耐性の形成に対する影響を観察する実験では、注入開始3日目から7日目まで一日一回MAP (4mg/kg) を腹腔内に投与した。また、Mrt1蛋白発現を検討する場合は、注入開始3日目にMAP (4mg/kg) を投与し3時間後に脳組織サンプルを取り出した。

#### (5) ヒト *mrt1* 相同遺伝子の検索

ラット *mrt1* の翻訳領域をプローブとして、ヒト脳cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。また、得られたcDNAをもとに、RACE法 (rapid amplification of cDNA ends) によって5'領域、3'領域の解析を行った。さらにキャップサイトcDNA (NIPPON GENE社) を用いてCap site hunting法を行い、ヒトMRT1の翻訳開始点を検索した。

#### (6) ノーザンブロット分析

ヒトMRT1の配列をもとに約400 bpの<sup>32</sup>Pでラベルしたプローブを作製し、脳各部位と各末梢臓器から抽出したRNAのpoly(A)-positive fractionをトランスファーした市販のメンブランを用いて (Clontech) ノーザンブロット分析を行った。

### C. 研究結果

#### (1) 大脳新皮質におけるMrt1蛋白の局在

*mrt1* の塩基配列から、Mrt1蛋白はひとつのPDZドメインをもつことが推測されていたため、神経系ではシナプスに局在する可能性を中心に検討した。

前シナプスのマーカー蛋白と考えられるSNAP-25およびKv1.4の免疫反応は、シナプトゾーム画分で強く、postsynaptic densityで弱かった。反対に、後シナプスのマーカー蛋白とされるPSD-95の免疫反応は、postsynaptic densityで強く、シナプトゾーム画分で弱かった。さらに、actinに対する免疫反応はすべての脳組織サンプルに認められた。これらの結果より、今回の実験では、各脳組織画分からの蛋白質が適切に抽出されていることが裏付けられた。

脳のコモジネートでは、3種類の抗体すべてに対する免疫反応が62kDa付近のバンドとして検出された。シナプトゾーム画分においては、Mrt1AとMrt1Bの双方に反応する抗体とMrt1Bに結合するがMrt1Aには結合しない抗体への免疫反応が認められたのに対して、Mrt1A特異的抗体に対する免疫反応は非常に低いレベルであった。postsynaptic densityでは、3種類の抗体いずれによっても、ほとんど免

疫反応が見られなかった。

(2)*mrt1*に対するアンチセンスオリヌクレオチドのMrt1蛋白発現への影響

このうちMAPによって発現誘導が見られるバリエーションにコードされるMrt1Bは、大脳新皮質において、ホモジネートとシナプトゾーム画分に豊富に含まれるが、postsynaptic densityには少ない分布パターンを示し、主として前シナプス側に局在することが推測された。これに対してMAPに反応しないバリエーションの産物であるMrt1Aは、シナプトゾーム画分に免疫反応が認められなかった。

これまでに報告したように、anti-*mrt1* oligonucleotideを脳室内注入したラットでは、MAPを反復投与しても逆耐性が形成されないことが確認された。アンチセンスオリゴマーを注入している条件下では、Mrt1蛋白 (Mrt1AとMrt1B) の基礎的発現量が低下していた。また、ミスセンスオリゴマーを投与した対照群の線条体では、MAP投与時にMrt1蛋白量が増加したが、アンチセンスオリゴマー投与群では変化がなかった。

(3)*mrt1*のヒト相同遺伝子の検索

ラット*mrt1*の翻訳領域をプローブとして、ヒト脳cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、ラット*mrt1*の相同遺伝子と思われるヒトMRT1a、MRT1bを分離した。ヒトMRT1は、翻訳領域ではラット*mrt1*に対して塩基配列で約93%、アミノ酸配列で約98%の相同性を示した。ヒトMRT1の配列をもとに約400bpの32Pでラベルしたプローブを作製し、ノーザンブロットでヒトの組織におけるMRT1の分布を調べた。その結果、

MRT1a、MRT1bに相当する約6.8kbと約7.6kbの二本のバンドがみられ、前頭葉、側頭葉、小脳、脊髄などを含む中枢神経部位で発現が確認された。

D. 考察

(1)大脳新皮質におけるMrt1蛋白の局在

今年度の抗体を用いたMrt1蛋白の解析結果は、cDNAの塩基配列から予想されるMrt1蛋白の特徴を支持した。すなわち、Mrt1蛋白には少なくともC末端領域が異なる2種類があり、ウェスタンブロット上のサイズはコーディングフレームから期待されるサイズと一致することが確認された。

大脳新皮質組織中において、MAP投与に反応しないmRNAバリエーションがコードするMrt1Aの免疫反応は、ホモジネートでは高かったが、シナプトゾームとpostsynaptic densityにはきわめて低かった。一方、MAP投与により発現が誘導されるバリエーションがコードするMrt1Bは、ホモジネートとシナプトゾームに高く、postsynaptic densityに低い免疫反応のパターンを示した。Mrt1AとMrt1Bの双方に反応する抗体を用いると、抗Mrt1B抗体と同様の免疫反応の分布が見られることを考えあわせると、これらの所見は、Mrt1Bは少なくともシナプスに存在し、主に前シナプス側に局在する可能性を示唆している。予備的な免疫組織化学的検討でも、大脳新皮質でapical dendrite上にpunctate patternが認められ、この仮説と矛盾しなかった。

(2)*mrt1*に対するアンチセンスオリヌクレオチドのMrt1蛋白発現および逆耐性形成

への影響

アンチ*mrt1*オリゴヌクレオチドを持続注入した時のMrt1蛋白発現への影響は、注入部位の近傍にある右側線条体組織で検討した。注入開始3日目では、ミスセンスオリゴマー投与対照群に比してMrt1蛋白（Mrt1AとMrt1B）の発現量が有意に低下していることから、アンチオリゴマーが有効に作用し*mrt1*遺伝子の発現を抑制していることが確認された。また、この条件下では、MAPによる発現上昇が完全に抑制され、逆耐性現象が成立しなくなることがわかった。したがって、逆耐性の形成には、*mrt1*遺伝子が翻訳され、Mrt1B蛋白が増加することが必要と考えられる。

Mrt1蛋白の機能については今後さらに検討しなければならないが、上述したように（(1)の項参照）PDZドメインをもちシナプスに存在していることから、シナプスで機能する蛋白に結合してシグナル伝達の調節に関与する可能性がある。他のPDZ蛋白には、神経伝達物質の受容体・トランスポーター・遊離装置等と細胞骨格蛋白等を結合させる働きをもつものが多く知られている。したがって、中枢刺激薬投与後の発現増加は、神経可塑性の基礎となるシナプスの再構築が生じていることを反映する所見かもしれない。そこで、今後はMrt1蛋白と相互作用をもつ分子の検索や、Mrt1蛋白あるいは*mrt1*遺伝子の発現に関する組織化学的検討を行い、逆耐性現象の神経機構にアプローチする予定である。

### (3)*mrt1*のヒト相同遺伝子の検索

これまでの研究結果は*mrt1*が逆耐性現

象の分子カスケードに関与することを強く示唆している。したがって、覚醒剤精神病、精神分裂病等の発症あるいは再燃における分病態に深く関係すると考えられる。今回報告したように、ヒト相同遺伝子が検出され、現在、精神疾患患者における解析を進めている。

### E. 結論

(1) 乱用薬物による脳機能障害の分子機構にアプローチする目的で、乱用の対象となる薬物による依存形成および精神症状が思春期以前には生じにくく、実験動物においても、これらの薬物による異常行動や脳の活動異常のパターンが生後発達に伴って変化することに注目し、ラット大脳新皮質より、MAPまたはPCPに一定の発達段階から成熟期における応答性を獲得する遺伝子のスクリーニングと解析を継続した。

(2) Amphetamine類やコカインが誘発する分裂病様幻覚・妄想状態の発症・再燃のモデルである行動感作（逆耐性現象）が形成され始める生後3週頃からMAPに応答性を示す*mrt1*遺伝子は、蛋白間の相互作用に関与するPDZおよびPXドメインをもつ、少なくとも2種類の蛋白質（Mrt1AおよびMrt1B）をコードすることが明らかになった。このうち、Mrt1Bはシナプスに局在することが示唆された。また、MAP投与後に発現が誘導されるのはMrt1Bをコードしているスプライズバリエーションであることがわかった。

(3) アンチ*mrt1*オリゴヌクレオチドを脳室内に持続注入すると逆耐性の形成が阻止された。注入側の線条体においては、

Mrt1AおよびMrt1Bの双方に反応する抗体で認識されるMrt1蛋白の発現総量が有意に低下し、ミスセンスオリゴマーを注入した対照群（逆耐性が形成される）で見られるMAP急性投与による発現増加が抑制された。これらの結果は、Mrt1蛋白が逆耐性現象の形成過程に関与することを支持している。

(3) *mrt1*のヒト相同遺伝子を同定しゲノム配列の解析を進めた。

#### [参考文献]

1) Beck, L., Langford, W.S., Mackay, M. et al.: Childhood chemotherapy and later drug abuse and growth curve: a follow-up study of 30 adolescents, *Am. J. Psychiatry*, 132: 436-438, 1975.

2) Carlin, R. K., Grab, D. J., Cohen, R. S. et al.: Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J. Cell Biol.* 86, 831—843 (1980).

3) Fujiwara Y., Kazahaya M., Nakashima M., et al.: Behavioral sensitization to methamphetamine in the rat: an ontogenic study. *Psychopharmacol.* 91: 316-319, 1987.

4) 西川徹、梶井靖、藤山航、他：乱用薬物による脳機能障害の分子機構解明。厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）「規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究」平成11年度研究報告書（佐藤光源 編）、pp. 104-110、1999.

5) 西川徹、梶井靖、平岡秀一、他：乱用薬物による脳機能障害の分子機構解明。

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）「規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究」平成11年度研究報告書（佐藤光源 編）、pp. 108-113、2000.

6) 西川 徹、海野麻未、梶井 靖、他：分裂病の成因は薬理・生化学的アプローチから解明されるか *精神科治療学* 12:617-623, 1997.

7) Nishikawa T., Umino A., Kashiwa A., et al.: Stimulant-induced behavioral sensitization and cerebral neurotransmission. In *Neurotransmitters in neuronal plasticity and psychiatric disorders*, pp. 53-62, Excerpta Medica, Ltd. Tokyo, 1993.

8) Paxinos, G. & Watson, C. (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd edn. Sydney: Academic Press.

9) Reich D.L., and Silvey G.: Ketamine. an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can J Anaesth*, 36: 186~197, 1989.

10) Rapoport, J.L., Buchsbaum, M.S., Weingartner, H. et al.: Dextroamphetamine. Its cognitive and behavioral effects in normal and hyperactive boys and normal men, *Arch. Gen. Psychiatry*, 37 (1980) 933-943.

11) Sato D., Umino A., Kaneda K., et al.: Developmental changes in distribution patterns of phencyclidine-induced c-Fos in rat forebrain. *Neurosci. Lett*, 239: 21~24, 1997.

12) Toda S, Kajii Y, Sato M, and Nishikawa T: Reciprocal expression of infant- and adult-preferring transcripts of *CDCrel-1* septin gene in the rat neocortex. *Biochem Biophysiol Res Com* 273: 723-726, 2000.



平成12年度 分担研究者氏名一覧

規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究

| 区分 | 氏名     | 所属施設・職名                        | 住所  |
|----|--------|--------------------------------|---|
| 主任 | 佐藤 光源  | 東北大学大学院医学系研究科<br>精神神経学分野・教授    | 〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1<br>TEL:022-717-7262    |
| 分担 | 伊豫 雅臣  | 千葉大学医学部<br>精神医学講座・教授           | 〒260-8670 千葉市亥鼻1-8-1<br>TEL:043-226-2148      |
| 分担 | 丹羽 真一  | 福島県立医科大学<br>精神医学教室・教授          | 〒960-1295 福島市光が丘1<br>TEL:024-548-2111         |
| 分担 | 西川 徹   | 国立精神・神経センター<br>神経研究所疾病研究第3部・部長 | 〒187-8052 小平市小川東町4-1-1<br>TEL:0423-46-1714    |
| 分担 | 氏家 寛   | 岡山大学医学部<br>神経精神医学教室・講師         | 〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1<br>TEL:086-235-7241     |
| 分担 | 小山 司   | 北海道大学医学部<br>神経機能学講座・教授         | 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目<br>TEL:011-736-0956   |
| 分担 | 鍋島 俊隆  | 名古屋大学医学部附属病院薬剤部<br>教授・薬剤部長     | 〒466-8560 名古屋市昭和区鶴舞町65<br>TEL:052-744-2674    |
| 分担 | 山本 経之  | 九州大学大学院薬学研究科<br>薬理学教室・助教授      | 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1<br>TEL:092-642-6629    |
| 分担 | 三木 直正  | 大阪大学大学院医学系研究科<br>情報薬理学教室・教授    | 〒565-0871 吹田市山田丘2-2<br>TEL:06-6879-3520       |
| 分担 | 五味田 裕  | 岡山大学医学部附属病院薬剤部<br>教授・薬剤部長      | 〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1<br>TEL:086-235-7640     |
| 分担 | 佐藤 公道  | 京都大学大学院薬学研究科<br>生態機能解析学分野      | 〒606-8501 京都市左京区下阿達町<br>TEL:075-753-4526      |
| 分担 | 長谷川 高明 | 名古屋大学医学部保健学科<br>検査技術専攻基礎検査学・教授 | 〒461-8673 名古屋市東区大幸南1-1-20<br>TEL:052-719-1506 |
| 分担 | 笹 征史   | 広島大学医学部<br>薬理学教室・教授            | 〒734-8551 広島市南区霞1-2-3<br>TEL:082-257-5142     |
| 分担 | 大熊 誠太郎 | 川崎医科大学<br>薬理学教室・教授             | 〒701-0192 倉敷市松島577<br>TEL:086-462-1111        |
| 分担 | 鈴木 勉   | 星薬科大学<br>薬品毒性学教室・教授            | 〒142-8501 東京都品川区荏原2-4-41<br>TEL:03-5498-8787  |