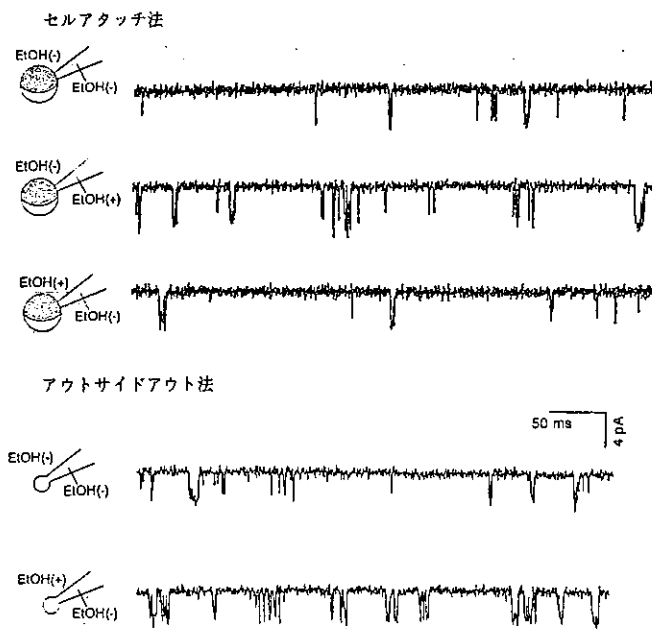


第3図 GIRK チャンネルの構造

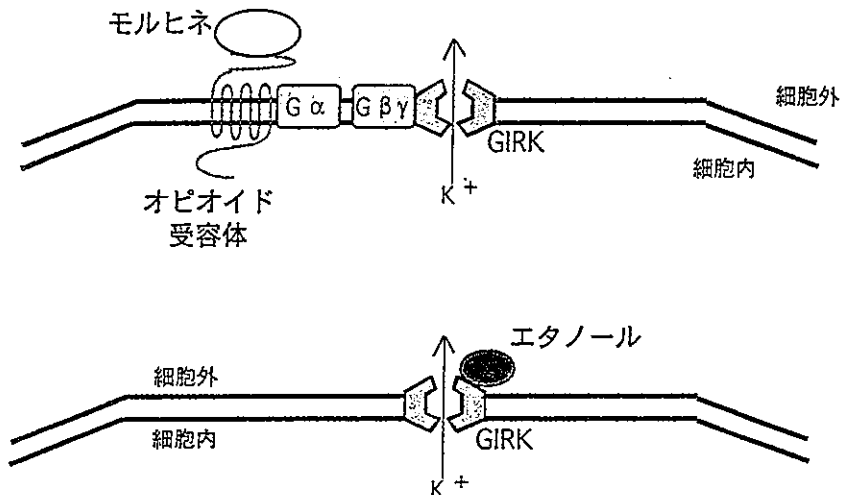
GIRK チャンネルサブユニットは細胞膜を2回貫通し (M1, M2), H5 と呼ばれる領域が膜に食い込む構造をとる。チャンネルはサブユニットが4つ組合わさることにより形成される。H5 領域はチャンネルの内側を構成し、イオンの選択性や透過性を決定する重要な領域である。



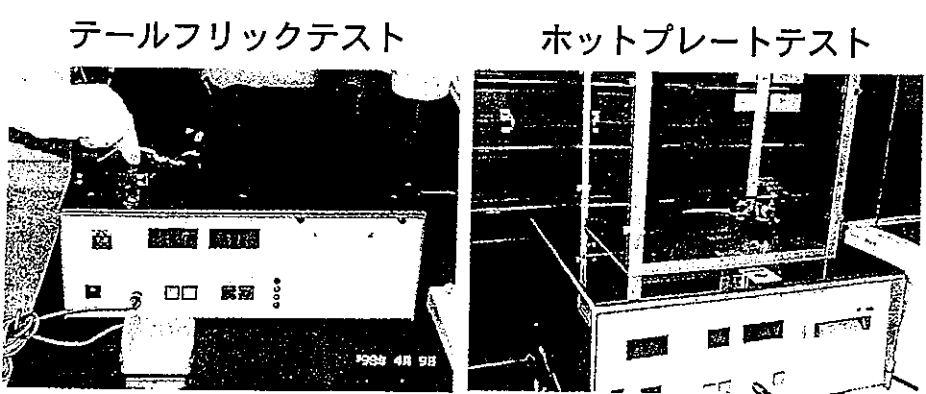
第4図 単一チャンネル解析

接開口させることを明確に示すことに成功した (第4図)。GIRK チャンネルを発現させた卵母細胞に直径1マイクロメートルほどの微小なガラス電極を触れさせ、電極で囲まれたパッチ膜部分に存在するチャンネルの挙動を解析した場合、チャンネルが直接エタノールと接触するときのみチャンネルの開口が認められた (第4図; セルアタッチ法)。電極先端に一部の卵母細胞膜を切

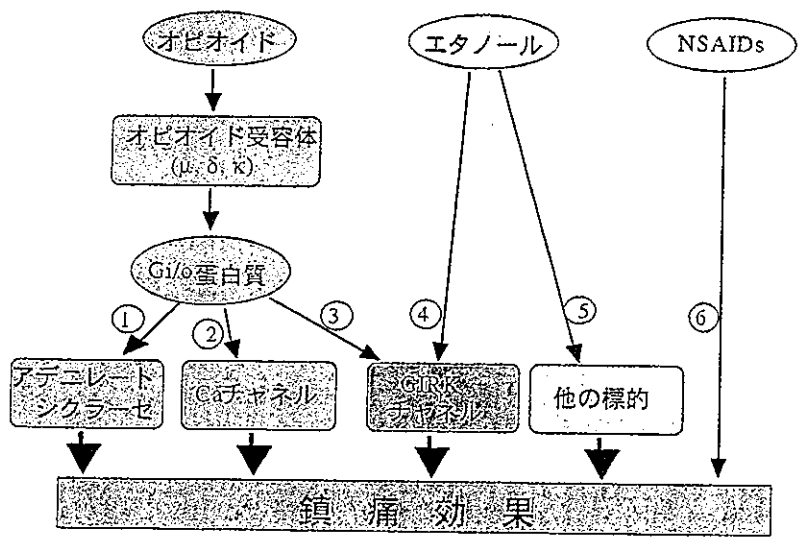
り離してその膜内のチャンネルを調べた場合でも同様の結果であった (第4図; アウトサイドアウト法)。従って、第5図に示すようにモルヒネなどのオピオイド作動薬の場合はオピオイド受容体とG蛋白質を介してGIRK チャンネルが開くものに対して、エタノールの場合はGIRK チャンネルを直接開口させる。



第5図 エタノールとオピオイドによる GIRK チャンネル開口機序の違い
 モルヒネなどのオピオイドはその受容体を活性化し G 蛋白質を介して GIRK チャンネルを開くのに対して，エタノールは直接 GIRK チャンネルを開口させる。



第6図 鎮痛効果テスト



第7図 鎮痛の分子経路

4. アルコールによる鎮痛と GIRK チャンネル

アルコールは多種の生理作用を持つ。そこで著者らは次にアルコールによる GIRK チャンネルの開口がその中でどのような作用と関係しているのかを調べ、GIRK チャンネルの開口がエタノールの鎮痛作用と密接に関係していることを明らかにした。著者らは、GIRK2 サブユニットの H5 領域 (第3図参照) に1つのアミノ酸置換があり脳型 GIRK チャンネルの機能が異常になっているウィーバーミュータントマウスに注目した。まず、ウィーバーミュータントマウスが持つ GIRK チャンネルの機能をアフリカツメガエル卵母細胞を用いて検討した結果、この変異型チャンネルはエタノールによって影響されないことが明らかになった。つまり、ウィーバーミュータントマウスではエタノールによる GIRK チャンネルの開口が障害を受けている。そこでこのミュータントマウスにおける様々なエタノール作用を検討した。エタノールには体温や心拍数を下げる効果があるが、これらはミュータントマウスでも正常マウスと同様に認められた。また、エタノールには催眠作用があるので、アルコールを投与したマウスを仰向けに寝かせると数十分間そのままの姿勢をとる。ウィーバーミュータントマウスは、正常マウスと同様の時間仰向けになった後、正常に起きあがるようになった。つまりエタノールによる催眠作用にも異常がなかった。人の場合と似ているが、マウスの場合でも少量のアルコールを投与されたときは活動量が上がり、多量のアルコールを投与されたときは鎮静作用により活動量が下がる。このような活動性に対するアルコールの効果調べてもウィーバーミュータントマウスには特に異常が認められなかった。最後に、第6図に示す鎮痛効果測定装置を用いてエタノール鎮痛効果を検討した。テールフリックテストではマウスの尻尾に熱線をあてて尻尾をよけるまでの時間を測定し、ホットプレートテストではマウスを52度の金属板の上に乗せて後ろ足を舐めるまでの時間や飛び上がるまでの時間を測定する。これらのテストの結果、正常マウスでは投与するエタノール量に応じた鎮痛が認められたのに対して、ウィーバーミュータントマウスではほとんど鎮痛効果が認められなかった。鎮痛効果以外の基本的なエタノール作用ではウィーバーミュータントマウスに異常が認められなかったことは、鎮痛効果

テストの結果は他の生理作用の違いによる二次的な結果では無いことを示唆している。つまりウィーバーミュータントマウスではエタノールによる鎮痛作用が特異的に減弱していると結論できる。以上の実験結果より、エタノールによる GIRK チャンネルの開口はエタノール鎮痛の分子機序であると考えられる。

5. 鎮痛効果におけるエタノールとモルヒネとの類似性

モルヒネは強い鎮痛薬として古くから用いられており、ペインクリニックの重要性が認知された現在ではますますその重要性が増している薬物である。前述の通り、モルヒネはオピオイド受容体を介して Gi/o 型の G 蛋白質を活性化し GIRK チャンネルを活性化するが、第7図に示すとおり、Gi/o 型の G 蛋白質の活性化はアデニル酸シクラーゼの機能を抑制し (第7図の経路1)、カルシウムチャンネルを閉口させる (第7図の経路2)。モルヒネが鎮痛効果を発揮する際、経路1, 2, 3 の内でどの経路が重要であるかは最近まで不明であった。著者らはウィーバーミュータントマウスの変異型 GIRK チャンネルが G 蛋白質による活性化を受けないことに注目してこのミュータントマウスにおけるモルヒネ鎮痛効果を検討し、モルヒネによる鎮痛の場合も GIRK チャンネルの開口が極めて重要であることを明らかにした⁶⁾。正常マウスとウィーバーミュータントマウスとにモルヒネを投与し、前述のテールフリックテストとホットプレートテストを行った結果、ウィーバーミュータントマウスでは有意に反応潜時が短くモルヒネによる鎮痛が減弱していた。ウィーバーミュータントマウスはどのような場合でも非特異的に鎮痛が現れにくい可能性が考えられたので、GIRK チャンネルを介さずに鎮痛を引き起こす非ステロイド性抗炎症剤 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs ; NSAIDs) のひとつであるアミノピリンによる鎮痛 (第7図の経路6) を検討した。その結果、ウィーバーミュータントマウスにおいても正常なアミノピリンによる鎮痛効果が認められた。従って、モルヒネによる鎮痛の場合も GIRK チャンネルの開口が極めて重要なステップであり、エタノールによる鎮痛と同様の分子メカニズムであることが考えられる。エタノールのように GIRK チャンネルを直接開口させるが、他の生体内標的に作用しない薬物を開発することがで

されば、副作用の少ない全く新しい鎮痛剤が誕生するかもしれない。

6. アルコールと脳研究

アルコールは広く人々に親しまれている飲み物であり、様々な脳機能に影響を及ぼすことから、アルコールに関する研究は脳研究の中で特に注目されている分野といえる。アルコール作用の分子メカニズムに関する研究では日本人の活躍が目立っているため、最近の興味深い知見をいくつか紹介する。理化学研究所の二木らは、Fynというチロシンリン酸化酵素の一つが欠失したマウスでは、催眠効果テストを行うとアルコール投与後に起きあがるようになるまでの時間が有意に長くなり、アルコールに弱くなっていることを見いだした⁷⁾。免疫システムの遺伝子メカニズムでノーベル医学生理学賞を受賞した利根川進教授は、現在脳研究を精力的に行っていて、アルコールに関しても興味深い報告をしている。利根川らは蛋白質リン酸化酵素C (PKC) のガンマタイプという蛋白質の遺伝子を欠失すると今度はアルコールに強いマウスとなり、アルコールを投与した後もすぐに起きあがることを示した⁸⁾。蛋白質リン酸化酵素は蛋白質の機能を修飾(活性化したり不活性化)する重要な蛋白質である。これらの研究から、エタノールの作用のいくつかは蛋白質のリン酸化・脱リン酸化のバランスが変わることによって生じていることが考えられる。また、著者(曾良)らはモルヒネの生体内標的であるミューオピオイド受容体の遺伝子を欠失させたマウスを作成し⁹⁾、エタノールの報酬効果を検討した¹⁰⁾。正常なマウスはエタノールを好むので、エタノールを投与されたときにいた環境を好むようになる。しかし、ミューオピオイド受容体を持たないマウスではこのような条件付けが起こりにくい。またエタノールと水を自由に飲めるようにすると正常なマウスではエタノールの摂取量が多いのに対して、この遺伝子欠損マウスではエタノールの摂取量が少ない。つまり、ミューオピオイド受容体がないとアルコールをあまり好まなくなってしまう。アルコール依存症の患者にオピオイド受容体拮抗薬が有効であることが知られているが、遺伝子欠損マウスを用いた実験結果はその分子メカニズムの解明に繋がるものである。このように、脳研究によってアルコールの作用機序が解明されつつあるが、逆にアルコールに関する

脳研究は、脳機能そのものを調べる上でも大変重要な糸口だと考えられる。例えば情動は研究が難しい脳機能の一つだが、アルコールという単純な分子によって明らかに影響を受ける。アルコールの脳内標的となる分子をつきとめてそれらの分子がどのように情動に影響するのかを一つ一つ研究することは、情動がどのような分子メカニズムで制御されているのかを解明する上で有効なアプローチと考えられる。アルコールと脳機能に関する研究は重要であり、今後ますます発展するものと期待される。(東京都精神医学総合研究所)

文 献

- 1) Narahashi T., Kuriyama K., Illes P., Wirkner K., Fischer W., Muhlberg K., Scheibler P., Allgaier C., Minami K., Lovinger D., Lallemant F., Ward R. J., DeWitte P., Itatsu T., Takei Y., Oide H., Hirose M., Wang X. E., Watanabe S., Tateyama M., Ochi R., Sato N., Neuroreceptors and ion channels as targets of alcohol, *Alcohol Clin Exp Res.*, (2001) 5 Suppl: 182 S-188 S.
- 2) Kobayashi, T., Ikeda, K., Kojima, H., Niki, H., Yano, R., Yoshioka, T. and Kumanishi, T., Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels, *Nature Neurosci.*, (1999) 2: 1091-1097.
- 3) 池田和隆, 小林徹「GIRK チャネル」生体の科学, 2001年4月52巻2号, 164-165, (財)金原一郎記念医学医療振興財団発行
- 4) Ikeda, K., Kobayashi, T., Ichikawa, T., Usui, H., Abe, S. and Kumanishi, T., Comparison of the three mouse G-protein-activated K⁺ (GIRK) channels and functional couplings of the opioid receptors with the GIRK1, *Annal. New York Acad. Sci.*, (1996) 801: 95-109.
- 5) Kobayashi, T., Ikeda, K., Ichikawa, T., Abe, S., Togashi, S. and Kumanishi, T., Molecular cloning of a mouse G-protein-activated K⁺ channel (mGIRK1) and distinct distributions of three GIRK (GIRK1, 2 and 3) mRNAs in mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1995) 208: 1166-1173.
- 6) Ikeda, K., Kobayashi, T., Kumanishi, T., Niki, H. and Yano, R., Involvement of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺

- (GIRK) channels in opioid-induced analgesia, *Neurosci. Res.*, (2000) 38: 111-114.
- 7) Miyakawa, T., Yagi, T., Kitazawa, H., Yasuda, M., Kawai, N., Tsuboi, K. and Niki, H., Fyn-kinase as a determinant of ethanol sensitivity: relation to NMDA-receptor function, *Science*, (1997) 278: 698-701.
 - 8) Harris R. A., McQuilkin S. J., Paylor R., Abeliovich A., Tonegawa S. and Wehner J. M., Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-aminobutyrate type A receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1995) 92: 3658-3662.
 - 9) Sora I., Takahashi N., Funada M., Ujike H., Revay R. S., Donovan D. M., Miner L. L. and Uhl G. R., Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1997) 94: 1544-1549.
 - 10) Hall S., Sora I. and Uhl G. R., Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice, *Psychopharmacol.*, (2001) 154: 43-49.

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

池田和隆 <Kazutaka IKEDA>

昭和41年2月1日生れ<勤務先とその所在地>財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・分子精神医学研究部門, 〒156-8585 東京都世田谷区上北沢2-1-8<略歴>平成1年東京大学工学部反応化学科卒, 平成3年大阪大学大学院医科学修士課程修了, 平成7年新潟大学大学院医科学博士課程修了(医学博士), 平成7年4月理化学研究所研究員, 平成12年10月東京都精神医学総合研究所主任研究員<抱負>快情動の分子メカニズムの解明をライフワークとした<趣味>散歩, 旅行, テニス

小林 徹 <Toru KOBAYASHI>

昭和37年1月27日生れ<勤務先とその所在地>新潟大学・脳研究所・分子神経病理学, 〒951-8585 新潟市旭町通1-757<略歴>昭和62年新潟大学医学部医学科卒, 平成11年より新潟大学・脳研究所, 非常勤講

師, 理化学研究所・脳科学総合研究センター研究員(非常勤; 兼務), 平成13年より東京都精神医学総合研究所, 客員研究員(兼務)。精神科医, 医学博士。<抱負>精神疾患, 精神機能を分子レベルから解明すること。<趣味>旅行, ドライブ

曾良一郎 <Ichiro SORA>

昭和32年1月31日生れ<勤務先とその所在地>財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・分子精神医学研究部門, 〒156-8585 東京都世田谷区上北沢2-1-8<略歴>昭和57年岡山大学医学部卒, 昭和61年岡山大学大学院博士課程修了(医学博士), 平成3年米国アリゾナ大学客員研究員, 平成5年米国NIH薬物依存研究所客員研究員, 平成8年同室長, 平成11年東京都精神医学総合研究所部門長<抱負>精神疾患の分子機構の解明<趣味>映画鑑賞

オピオイド受容体ノックアウトマウスの作製・解析の概要

曾良 一郎^{1),2)}, 池田 和隆³⁾, 三品 裕司³⁾

要約：オピオイド系の分子メカニズムの研究は、遺伝子ノックアウト動物モデルを利用することにより、作動薬、拮抗薬などを用いるだけでは為し得ない解析が可能となった。遺伝子ノックアウトマウス作製は、分子遺伝学、細胞培養、発生工学の実験手技の集大成であり、長期にわたる労働集約的な実験作業を要するプロジェクトである。ターゲティングベクター作製のためのゲノム DNA の入手から始まり、ES 細胞への遺伝子導入、キメラマウス作製の後に、はじめてノックアウトマウスを得ることができる。また、表現型を行動学的、解剖学的、生化学的に解析する際に、ノックアウトマウスであるが故の留意点もある。本稿では、新規のみならず既知のノックアウトマウスの解析を予定されている研究者も対象に、概略的知識および成功を左右するいくつかのコツを、筆者らの経験をもとに紹介する。

1. はじめに

モルヒネに代表されるオピオイドは強力な鎮痛作用と報酬作用を併せ持ち、古くから臨床的にきわめて重要な薬物である。オピオイド系は μ , δ , κ と名付けられた 3 種の受容体と、構造的に相互に類似した内因性オピオイドペプチドファミリーから成り立つ (1)。ことに、 μ オピオイド受容体はモルヒネの主要な標的分子であり、鎮痛、情動の

みならず内分泌機能、記憶学習など広範な生理機能の調節に関わっている。このようにオピオイド系は、様々な角度から薬理的な研究対象となっていたが、遺伝子ノックアウト動物モデルが利用できるようになり、作動薬、拮抗薬などを用いるだけでは為し得ない解析が可能となった。

ノックアウトマウス作製技術 (ジーン・ターゲティング法) によってマウス染色体の遺伝子配列を自由自在に変換させることが可能になった。このジーン・ターゲティングが可能となった背景には発生工学の発展によるマウス胚性幹 (embryonic stem: 以下 ES) 細胞の樹立と ES 細胞からのマウス個体作成技術の完成がある。ES 細胞はマウス個体全部を作り出す能力を持つ。この ES 細胞を正常なマウス胚に移植すると、ES 細胞とホスト胚の細胞が混ざったマウス個体 (キメラマウス) を生じる。さらに ES 細胞がキメラマウス体内で生殖細胞に分化すると、交配により ES 細胞由来の遺伝子を持つ子孫が得られる。このような性質を持つ ES 細胞において遺伝子組み換えを行い、目的とした遺伝子変異をもった ES 細胞株を得て、そこからマウスを作製することにより、目的の遺伝子改変をほどこしたマウスを得ることが可能となった。

約 30 億塩基数の染色体遺伝子核酸配列の中から目的の遺伝子に操作を加えるためには、相同遺伝子組み換えのメカニズムを利用する。この相同遺伝子組み換えの頻度は、単なる外来遺伝子の導入と比べて極めて低いので、効率的にスクリーニングを行うために薬剤耐性・死滅遺伝子を用いるポジティブ・ネガティブ選別法が開発されている。ES 細胞株は染色体遺伝子に操作を加える間も全能性を保持する必要があるが、Leukemia inhibitory factor (LIF) が ES 細胞の未分化能を維持することが明らかとなり、ジーン・ターゲティングが可能となった。

このように相同遺伝子組み換えのメカニズムを利用して遺伝子改変マウスを作製する技術が確立されたが、表 1 に示したようにノックアウトマウス作製は長期にわたる労働集約的な実験作業を要するプロジェクトと言える。すべての過程を自前で行うかどうかは状況により異なると思われるが、ノックアウトマウスの解析のみを行うとしても、ノ

キーワード：相同遺伝子組み換え, ES 細胞,
ターゲティングベクター, キメラマウス,
表現型解析

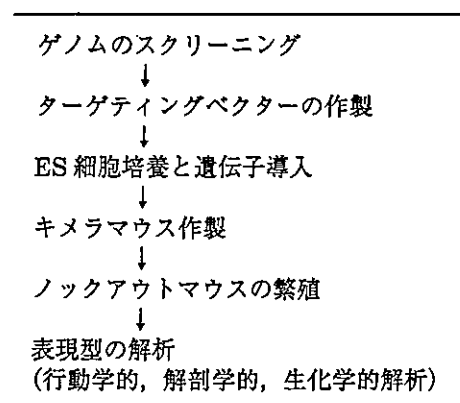
¹⁾ 東北大学大学院医学系研究科神経科学講座精神神経生物学分野 (〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1 番 1 号)

²⁾ 財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所分子精神医学研究部門 (〒156-8585 東京都世田谷区上北沢 2-1-8)

³⁾ Molecular Developmental Biology Group, Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences/NIH (111 T.W. Alexander Drive, P. O. Box 12233 Bldg. 101, Room C458A, MD C 4-10 Research Triangle Park, NC 27709 USA)

原稿受領日：2002 年 5 月 7 日、企画教育委員会依頼原稿

表1 ノックアウトマウス作製過程



ックアウトマウス作製の各過程を理解しておくことは極めて重要と考えられる。本稿では、紙面の制約があるので、概略的知識および成功を左右するいくつかのコツに焦点を絞って、筆者らの経験をもとに紹介してゆきたい。詳細な手法についてはプロトコール集(2~6)などを参照していただきたい。

2. ノックアウトマウス作製に必要な期間と研究資源

ターゲティングベクター作製にはゲノミック DNA のクローニングを終えているかどうかにもよるが、通常、数カ月を要する。ES細胞へのターゲティングベクター導入に続く相同組み換え体の選別にも、通常、数カ月を要する。さらに、キメラマウス作製には数カ月から半年を要する。このように最初のキメラマウスを得るまでに約1年を要する。幸いノックアウトした遺伝子が致死性でなくホモマウスが得られたとして、表現型の解析を解剖学的、行動学的、生化学的に一通り行うには、解析に必要な数のマウスを繁殖するために通常、半年は要すると考えられる。これは、すべての過程が順調に進んだ場合であり、いずれかのステップでトラブルがあればさらに完成までの期間は延びる。結論として、新規のノックアウトマウス作製・解析のプロジェクトは通常、2年以上の間、さまざまな研究資源を集中して投入する必要があるといえる。さらに表現型の解析についても、単一の研究室ですべての解析を行うことは容易でないことから、専門領域の解析を得意とする他の研究室との連携も必要となる。

ノックアウトマウス作製は、分子遺伝学、細胞培養、発生工学に加えて動物管理技術が集大成された技術といえる。マウス作製後は表現型の解析として解剖学的、行動学的、生化学的解析法が必要とされる。この中で、遺伝子クロー

ニングなどの組み換え DNA 技術を中心とする分子遺伝学的手法は最近では一般的になってきているので、ターゲティングベクター作製のステップは、多くの研究室で多大な負担なく実行可能と思われる。しかし、ES細胞は、注意深く培養しなければ容易に分化し全能性を失うため、通常の不活化した培養細胞と同様に扱うと失敗する。たとえ多分化能を保持していても生殖細胞に分化しなければ、ES細胞の寄与率が高いキメラマウスが得られたとしてもヘテロマウスは得られない。全能性のうちで、生殖細胞への分化能が最も障害され易いと言われている。さらに、キメラマウス作製は、初期胚を扱う発生工学の領域であり、ES細胞の初期胚へのマイクロインジェクション、偽妊娠マウス子宮への胚移植など、極めて特殊な実験手技を必要とすることから、研究室への導入には多大な初期投資を必要とする。

以下、ノックアウトマウス作製の各過程について概略およびコツを紹介する。

3. ターゲティングベクター作製法

ターゲティングベクターは目的とした遺伝子座の DNA と相同組み換えさせるためのベクターであり、ポジティブ選択のための薬剤遺伝子を相同 DNA 領域で挟んで、薬剤遺伝子の両側で相同組み換えを起こさせる (図1)。ターゲティングベクターはマウスを作製した後は修正・変更が不可能なため、十分な準備をして周到にベクターの構築を行う必要がある。最初に、遺伝子のどの領域を欠損させるかを決定する必要がある。遺伝子が単一のエクソンより構成され、全エクソンを欠損させることが可能ならば、確実にタンパク質の発現を阻害することができる。しかし、複数のエクソンで構成される遺伝子では、すべてのエクソンを欠損させることは難しいために、開始コドンを含む上流のエクソンを欠損させることが望ましい。その際に転写調節領域も同時に欠損させることができれば、なお良いと思われる。

ノックアウトマウスの作製は表1に示したように、まず、ターゲティングベクターを作製するために標的遺伝子のゲノム DNA クローニングから始める。欠損予定部位の DNA 配列などをプローブに用いてゲノミック DNA ライブラリーよりスクリーニングを行う。ゲノミック DNA ライブラリーは実際のマウス作製に用いる ES細胞由来のものを用いる。相同遺伝子組み換えの効率を上げるためには、ターゲティングベクターと ES細胞の遺伝子配列が厳密に相同であることが重要である。例えば、ES細胞が 129/SvE 系であったなら、ゲノミック DNA ライブラリーは 129/SvJ 系ではなく 129/SvE 系からのものを用いることをお勧め

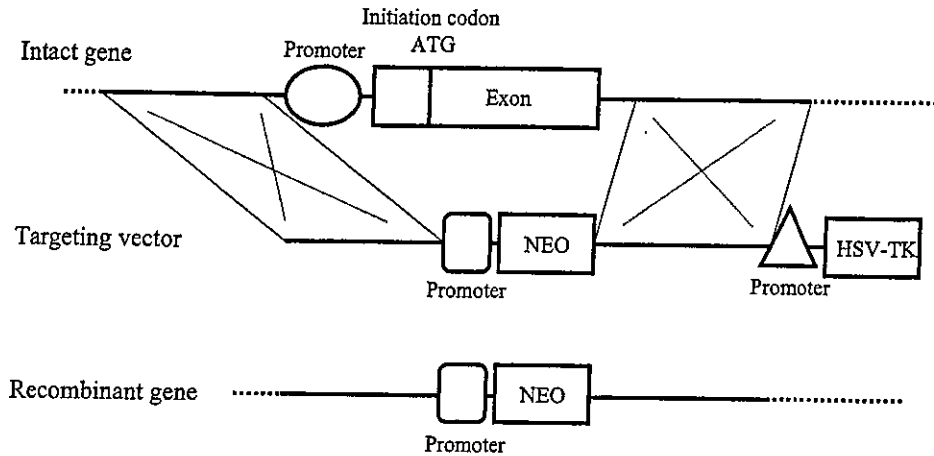


Fig. 1 Schematic illustration indicating homologous recombination

表2 ターゲティングベクター作製上の注意点

1. 上流のエクソンを欠損させる
2. ターゲティングベクターとES細胞の遺伝子配列が厳密に相同
3. 相同遺伝子領域の合計が6kb以上
4. サザンブロッティング法には安価でしかもDNA切断効率の良い制限酵素

する。最近では、Bacterial Artificial Chromosome (BAC) としてゲノミックDNAが商品化されていることから、目的のゲノミックDNAが比較的容易に入手できるようになった。

ターゲティングベクター構築の際には、組み換え体を得るためのスクリーニングの負担を軽減するためにも、表2の注意点とともに以下のような相同組み換えの頻度を上げるための工夫を行うことを勧める。

- ① DNA長：できる限り相同DNA領域を長くする。5'領域と3'領域の合計が6kb以上必要とされることが多く、長くなるほど相同組み換えの効率は増加する。但し、相同DNA領域を長くすると、ターゲティングベクター構築の際にサブクローニングの難度が増えるとともに、組み換えを検出するためのサザンブロッティングの難度も増える。
- ② ポジティブ選択：ネオマイシン (neo) 耐性などの薬剤耐性遺伝子を5'領域と3'領域の相同遺伝子領域の間に挿入し、ターゲティングベクターを構築する。これにより、ターゲティングベクターを導入すると、ベク

ターとES細胞遺伝子の間で、5'領域と3'領域の相同DNA配列においてそれぞれ相同組み換えが起こり、欠損させたい標的遺伝子の領域と薬剤耐性遺伝子とが置き換る(図1)。薬剤耐性遺伝子が導入されないES細胞はネオマイシンなどの薬剤投与により死滅させることができる。

- ③ ネガティブ選択：ポジティブ選択のみでは、標的遺伝子以外のDNA領域にターゲティングベクターが導入された場合もES細胞は生存するため、標的遺伝子が欠損したES細胞を得るには多くのスクリーニングを行う必要がある。スクリーニングの効率を増すために、致死性のHSV-tk遺伝子やDT-A遺伝子を5'領域と3'領域の相同遺伝子領域の外側に加える。これにより、標的遺伝子以外の遺伝子上の部位にターゲティングベクターが導入された場合は通常、致死遺伝子は残存し、標的遺伝子部位に導入された場合には致死遺伝子が除去される。このネガティブ選択をポジティブ選択と組み合わせることにより標的遺伝子部位に変異が導入されたES細胞を効率よく選別することが可能となる。
- ④ 遺伝型判定：相同組み換えが起こったES細胞を選別するにはPCR法とサザンブロッティング法とがある。PCR法は簡便だが、擬陽性的の場合もあることから、サザンブロッティング法でもスクリーニングが可能になるようにターゲティングベクターをデザインする必要がある。サザンブロッティング法に用いる制限酵素は、ES細胞の選別だけではなく、ノックアウトマウス完成後の遺伝型の判定にも用いられることから、安価でしかもDNA切断効率の良いBamHI, EcoRIなどが好ましい。制限酵素は必ずしもBamHI, EcoRI

などでなくとも良いが、より良い制限酵素を使えるようターゲットベクター構築のデザインに知恵を絞ることをお勧めする。さらにはマウス遺伝型の判定の効率に大きく影響することから、ベクター構築を始める前に十分な時間と労力を費やすに値すると思われる。

4. ES細胞培養と遺伝子導入法

ES細胞培養の基本は、いかにして全能性を保持するかである。たとえ目的の遺伝子に変異を導入することが成功したとしても、全能性を失ってしまっているキメラマウス作製を成功させることができない。ES細胞は、培養に用いるウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS) の種類によっては分化して全能性を失ってしまうことから、FBSの選定は極めて慎重に行う必要がある。FBSは、購入前にあらかじめ少量のサンプルを取り寄せてロットチェックを行い、ES細胞の培養状態をチェックする。培養状態の良いロットを見いだしたら、十分な量をまとめて購入することをお勧めする。FBSのメーカーは、Hyclone社 (Logan, UT USA, <http://www.hyclone.com/>) が評判が良い。

ES細胞の全能性を保持させるために、ES細胞はフィーダー細胞の上で培養を行う。フィーダー細胞はES細胞と同時に培養されるために、ネオマイシン耐性である必要がある。組み換えによりネオマイシン耐性とした不死化繊維芽細胞と、他のノックアウトマウス胎仔から得た初代培養繊維芽細胞のどちらもフィーダー細胞として用いることができるが、ES細胞を分与してもらった研究室で使われているフィーダー細胞を使うのが好ましいと思われる。著者自身の経験では初代培養細胞の方が少し優れていた印象がある。初代培養細胞には分裂に限りがあるために、あらかじめ凍結ストックを作っておくことをお勧めする。フィーダー細胞は作製時にマイトマイシンCで増殖能を消失させる処置を行い、1週間以内に使用する。ES細胞の培養には、前もってフィーダー細胞の作製が必要なために、実験スケジュールは厳密に計画する必要がある。

ES細胞は増殖速度が速いので、必ず毎日、培地交換を必要とする。また、継代の数時間前にも必ず培地交換を行う。ES細胞の細胞密度が増えすぎると容易に分化し生殖細胞への分化能を失うために、継代のタイミングに注意を怠らないように毎日最低1回は観察する。また、生殖細胞への分化能を損なわないために、できるだけ少ない継代数のES細胞を入手する。遺伝子型判定法も含めてターゲットベクターの準備が完了するまでは培養を始めない、などの努力が重要である。

ES細胞へのターゲットベクター遺伝子導入にはエレクトロポレーション (電気穿孔法) を用い、その後ES

表3 ES細胞の培養上の注意点

1. ウシ胎仔血清はロットチェックの後にまとめて購入
2. 新鮮なフィーダー細胞の使用
3. ES細胞培養では、培地交換を必ず毎日
4. ES細胞の細胞密度を増やさない
5. ES細胞の継代数はできる限り少なく

細胞は一定の密度でフィーダー細胞上に蒔く。数日後にポジティブ・ネガティブ選択用の薬剤を加え、約1週間から10日後に形成されたコロニーをピックアップして、24あるいは96穴プレートに蒔き直す。ES細胞が適当な密度になった時点で継代して、半分は凍結し、残り半分は遺伝型解析用にさらに増やす。遺伝型解析は、PCR法あるいはサザンブロッティング法を用いる。表3にES細胞の培養上の注意点をまとめた。

5. キメラマウス作製法

相同組み換えの起こったES細胞が得られたら、次にこの細胞をマウス初期胚に導入する。キメラマウス作製には、多数の胚と移植するための偽妊娠雌マウスを計画的に用意しなければならない。採卵用雌マウスは、まだ性周期が確立されていない3-4週齢のC57BL/6マウスを用い、性ホルモンを投与して過排卵を誘発する。交配用雄マウスは10週齢以降のC57BL/6マウスを用いる。胚移植用偽妊娠マウスは、CD-1などの多産系で子育てが上手な系統を用いる。胚移植用偽妊娠マウスを作るための精輸管結紮雄マウスは、繁殖行動を起こす系統であればどの系統でもかまわなく、商業的にも提供されている。キメラマウス作製にはES細胞を胚盤胞や8細胞期胚にマイクロインジェクションする方法と、透明帯を除いた8細胞期胚とES細胞を凝集させる方法がある。初期胚に導入された未分化なES細胞は、正常な胚発生のもとで分化し、ホスト胚由来の細胞とともにキメラを形成する。導入したES細胞がキメラ個体内で生殖細胞に分化していれば、他のマウスと交配することにより遺伝子変異が子孫マウスに伝えられる。

次に、ヘテロマウスを得るために、キメラマウスをC57BL/6などの純系種と掛け合わせる。雄のキメラマウスが効率よくヘテロマウスを産出するが、雌のキメラマウスでも問題はない。褐色の体毛である129系マウス胚由来のES細胞を黒色のC57BL/6の胚にマイクロインジェクションした場合には、褐色と黒色の体毛が混じり合ったキメラマウスが生まれる。褐色の体毛が黒色にくらべて多いほ

表4 マウスデータベースの例

Tag#	Location	Color	ID #	Male parent	Female parent	Tagged Date	DOB	Sex	Genotype	Used	Date	Outcome	Date
60	RS	A	MK1-3-1	MK25	MK21	2/7/01	12/21/00	F	+/-	Breeder	3/2/01	Analgesia	9/12/01
61	LN	A	MK1-3-2	MK25	MK21	2/7/01	12/21/00	F	-/-			Died	3/10/01
62	R	B	MK1-3-3	MK25	MK21	2/7/01	12/21/00	M	+/-	CPP	5/16/01	euthanasia	5/16/01

Tag# (金属標識耳タグの識別番号), Location (金属耳タグの位置, L左, R右, Sスラッシュの耳切れ目, Nノッチの耳切れ目), Color (体毛, A茶色 (Agouti), B黒 (Black)), ID# (雄親のIDに基づいたナンバリング), Male parent (雄親の耳タグ識別番号), Female parent (雌親の耳タグ識別番号), Tagged Date (耳タグ取り付け日), DOB (生年月日), Sex (性別), Genotype (遺伝型), Used (使用用途), Date (使用年月日), Outcome (転帰), Date (転帰年月日)

ど, 129系マウス胚由来のES細胞の寄与率が高いことが推測され, ES細胞から発生した生殖細胞が多く存在することが期待される。しかし, ほとんど褐色のキメラマウスであっても, ヘテロマウスを生み出すことが保証されているわけではないので, ヘテロマウスが産生されたことが確認されるまでキメラマウスを作り続ける必要がある。

6. 動物管理技術

標的遺伝子に変異したヘテロマウスが得られたら, そのヘテロマウスをファウンダーとして次世代のヘテロマウスを数多く確保することが, 表現型の解析を効率的に進める上で重要である。129系マウス胚由来のES細胞を用いたキメラマウスと黒色のC57BL/6の交配により生まれたファウンダーヘテロマウスには, 同じ遺伝背景を持つ129/C57 F2マウスを掛け合わせる。コンジュニックマウス(例えば遺伝背景がC57BL/6)を得るには通常数年の歳月を要するので(10世代以上の戻し交配が必要), 早期にバッククロスを始めることをお勧めする。

十分な数のヘテロマウスが得られたならば, ホモマウスを得るためにヘテロマウス同士を交配させる。このヘテロマウスの仔は, 相同組み換えES細胞を選別したときと同じPCR法あるいはサザンブロッティング法を用いて, 遺伝型の判別を行う。ホモマウスを得る際にホモマウスの雌雄を掛け合わせれば, 遺伝型の判別の手間が省けるが, 129/C57などの混合遺伝背景の場合はお勧めしない。理由は, ホモマウスのみで継代繁殖させることにより, 遺伝子変異に適応した系統種に変化して, 継代後は作製初期の表現型とは異なってしまふ可能性があるためである。さらに, たとえ遺伝子変異の影響が無視される程度だとしても, ホモマウスのみで継代繁殖させることにより遺伝的に純系化してしまい, 野生型どうしの掛け合わせで継代されたマウス

とは, 遺伝背景が異なってしまう。ノックアウトマウスを作製した目的の中に, 行動薬理的な解析が含まれているなら, 遺伝背景には十分に注意しないと, 単なる遺伝背景による行動変化を標的遺伝子変異の結果と誤って解釈してしまう危険がある。

129/C57などの混合遺伝背景の場合は, 純系化を防ぐために10ペア以上の繁殖ペアで繁殖させることが好ましい。もし, 一つがいのノックアウトマウスだけを譲り受けた場合には, 129/C57 F2マウスを掛け合わせるなどして, 十分な遺伝的な多様性を確保する必要がある。10世代以上のバッククロスしたコンジュニックマウスが得られているならば, 純系化しているために遺伝的な多様性に気を配る必要はなく, ホモマウスどうし, 野生型どうしの掛け合わせも可能となる。

表現型の解析には, 遺伝型判別が前提となり, 正確な個体識別は必須の技術である。個体識別には, イヤーパンチ, トウクリップなどの方法もあるが, 筆者らは耳に金属標識タグを付けている。金属標識タグは, カスタムサービスとして標識遺伝子の略号と通しの識別番号が記されているものを注文している。耳金属標識タグ (small animal ear tag), 標識タグを装着するためのハサミの形状をしたアプリケーション (tag application) は, 室町機械 (<http://www.muromachi.com/>) が輸入を代行してくれる。マウスの管理は, この識別番号をもとにデータベースを作製しておくことと便利である。我々はこの金属標識耳タグの識別番号とは別に, 家系の理解を容易にする識別番号も使っている。金属標識耳タグの識別番号は通し番号であるが, 家系を表現する識別番号は雄を中心にナンバリングを行っている。例えばオピオイド受容体のノックアウトマウスの雄ファウンダーをMK-1-3とすると, その雄のn尾の仔はMK-1-3-1からMK-1-3-nとなる。5世代目のマウスはMK-1-3-7-11-

表5 行動学的解析のテストバッテリー

全身状態	: 体重, 体温, 体位
運動機能	: ローターロッドテスト ワイヤーハンギングテスト オープンフィールドテスト
感覚機能	: 嗅覚, 視覚, 痛覚試験 (ホットプレート, テールフリック)
記憶・学習機能	: モリス水迷路, 恐怖条件付け, 受動・ 能動回避

9となる。この標識法の利点は、継代繁殖のための繁殖ペアの選別の際に遺伝的に近いかどうか容易に理解できる点であり、交配の記録上も便利である。筆者らは、表4のようなエクセルを使ったデータベースを研究室のサーバーコンピュータの共有スペースに置き、研究室スタッフが自分の端末から容易にアクセスできるシステムを採用している。

7. 表現型の解析法

ノックアウトマウスの表現型解析を行う場合に、標的分子に関する情報が少ない時は、解析をできるだけ幅広くカバーする行動学的解析のテストバッテリー (表5) から始める。行動解析のテストバッテリーとしては、全般的な健康状態から始め、運動機能、痛覚を含む感覚機能、記憶・学習機能、不安・抑うつ等の情動機能がある。行動解析により変化が見いだされれば、解剖組織学的、生化学的、電気生理学的手法により、より詳細に解析を行う。遺伝子改変動物の行動解析が専門領域でない研究者を対象にした Crawley の著書(7) は、行動解析を始める上で参考になると思われる。オピオイド受容体のノックアウトマウスの場合には、オピオイド受容体欠損により変化する表現型が予測されることから、解析初期から鎮痛試験や報酬試験などを始めることができる。これまでにオピオイド受容体ノックアウトマウスは、 μ オピオイド受容体(8~12)、 δ 受容体(13)、 κ 受容体(14)のノックアウトマウスが作製されている。オピオイド受容体ノックアウトマウスの表現型の詳細については、総説(15~17)を参照していただきたい。

8. まとめ

最後に、新規のノックアウトマウス作製・解析には多くの時間と手間がかかることから、遺伝子改変マウスモデルの作成と解析を研究室の中心的な手法として長期的に行う場合を除いて、すべての手技を自前で準備することはお勧め

めしない。さまざまな遺伝子の欠損・変異マウスを継続的に作製する方針の研究室はむしろ小数と考えられる。多くの研究者は関心のある遺伝子の研究手段の一つとして、欠損・変異マウスの表現型の解析を考えていると思われる。単発のノックアウトマウス作製の場合は、ターゲティングベクターの作製は自前で行い、細胞培養、発生工学の実験手技の過程は経験、設備の整っている施設と共同研究等の連携をしながら進めることをお勧めする。特にこの場合、ベクターのデザインについては遺伝子型判定法も含めて連携する共同研究先と十分に議論を尽くす事が重要である。ノックアウトマウスを作製して欲しいとすでに完成されたターゲティングベクターを持ち込まれたことが何度もあるが、そのままではうまく働かないというケースがほとんどであった。

また、既存のノックアウトマウスを解析する上でもノックアウトマウス作製法の概略を把握しておくことは極めて重要である。既存のノックアウトマウスであっても、表現型の解析が十分に行われていないものも多いので、これから新規のノックアウトマウス作製を始められる方々だけではなく、既存のノックアウトマウスの解析を始めようとしている方々にも本稿がお役に立てば幸いである。

文 献

- 1) 佐藤公道: オピオイド鎮痛の分子生物学. 蛋白質 核酸 酵素 44, 1360-1368 (1999)
- 2) 八木 健: ジーンターゲティングの最新技術 効率よく確実なマウスの遺伝子組換えとクローン作製法 別冊実験医学 ザ・プロトコルシリーズ 羊土社, 東京 (2000)
- 3) 相沢慎一: ジーンターゲティング ES細胞を用いた変異マウスの作製 実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ 羊土社, 東京 (1995)
- 4) Joyner AL: Gene Targeting - A Practical Approach Second Edition. Oxford University Press, New York (2000)
- 5) Kmiec EB: Gene Targeting Protocols. In Methods in Molecular Biology, Humana Press, Clifton, NJ (2000)
- 6) Tymms MJ and Ismail I: Gene Knockout Protocols. In Methods in Molecular Biology, Humana Press, Clifton, NJ (2001)
- 7) Crawley JN: What's Wrong With My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice, Wiley-Liss (2000)
- 8) Matthes HW, Smadja C, Valverde O, Vonesch JL, Foutz AS, Boudinot E, Denavit-Saubie M, Severini C, Negri L, Roques BP, et al: Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature 383, 819-823 (1996)
- 9) Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL and Uhl GR: Opiate

- receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1544-1549 (1997)
- 10) Tian M, Broxmeyer HE, Fan Y, Lai Z, Zhang S, Aronica S, Cooper S, Bigsby RM, Steinmetz R, Engle SJ, et al: Altered hematopoiesis, behavior, and sexual function in mu opioid receptor-deficient mice. *J Exp Med* **185**, 1517-1522 (1997)
 - 11) Loh HH, Liu HC, Cavalli A, Yang W, Chen YF and Wei LN: Mu opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain Res Mol Brain Res* **54**, 321-326 (1998)
 - 12) Schuller AG, King MA, Zhang J, Bolan E, Pan YX, Morgan DJ, Chang A, Czick ME, Unterwald EM, Pasternak GW, et al: Retention of heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nat Neurosci* **2**, 151-156 (1999)
 - 13) Filliol D, Ghozland S, Chluba, J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort, K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, et al: Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet* **25** (2), 195-200 (2000)
 - 14) Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A, Le MM, Roques BP, Maldonado R and Kieffer BL: Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J* **17**(4), 886-897 (1998)
 - 15) 曾良一郎：特集，精神神経薬理学的領域におけるノックアウトマウスの応用，オピオイド受容体ノックアウトマウス。日本神経精神薬理誌 **19**, 239-249 (1999)
 - 16) Kieffer BL: Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* **20**(1), 19-26 (1999)
 - 17) 曾良一郎，池田和隆：遺伝子欠損マウスを含む動物個体レベルでのオピオイドの作用機序。オピオイド治療課題と新潮流，鎮痛薬・オピオイドペプチド研究会編，pp77-84，エルゼビア・サイエンスミクス，東京 (2001)

Abstract - Outline for generation and analysis of opioid receptor knockout mice. Ichiro SORA, Kazutaka IKEDA and Yuji MISHINA (Tohoku University Graduate School of Medicine, Department of Neuroscience, Division of Psychobiology, Sendai 980-8574, Japan).

Folia Pharmacol. Jpn. (Nippon Yakurigaku Zasshi) **120**, 47~53 (2002)

Knockout transgenic mice of opioid receptors make it possible to analyze molecular mechanisms of opioid receptors that could not be done by traditional pharmacological techniques. Generation of knockout mice requires a variety of technologies such as molecular genetics, cell biology, and embryology. Making knockout mice also requires a long period of labor-intensive work. Knockout mice can be obtained after several experimental steps: constructing a targeting vector, introduction of the vector into embryonic stem cell, and generation of the chimeric animal. Special attention may be required for behavioral and biochemical analyses of knockout mice. This review will be focused on the outline and pitfalls for audiences who are interested in analysis of existing knockout mice as well as making new ones.

Keywords: homologous recombination; embryonic stem (ES) cell; targeting vector; chimeric mouse; phenotype analysis

著者プロフィール

曾良 一郎 (そら いちろう)

東北大学大学院医学系研究科 神経科学講座 精神神経生物学分野, 教授, 医学博士.

◇1986年岡山大学大学院医学研究科(神経精神医学専攻)博士課程修了, '96年米国立衛生研究所(NIH)付属薬物依存研究所分子遺伝学研究室長, '02年東北大学大学院医学系研究科神経科学講座精神神経生物学分野教授.

◇研究テーマ: 薬物依存や機能的な精神疾患の遺伝子改変動物モデルを用いた分子遺伝学的研究.

◇趣味: 映画鑑賞, 旅行.

isora@mail.cc.tohoku.ac.jp



池田 和隆 (いけだ かずたか)

東京都精神医学総合研究所 分子精神医学部門, 主任研究員, 博士(医学).

◇1995年新潟大学大学院医学研究科(神経病理学専攻)博士課程修了, '95年理化学研究所研究員, '00年東京都精神医学総合研究所分子精神医学部門主任研究員.

◇研究テーマ: 快情動発現の分子メカニズムに関する研究.

◇趣味: 旅行, 散歩, テニス.

ikedak@prit.go.jp



三品 裕司 (みしな ゆうじ)

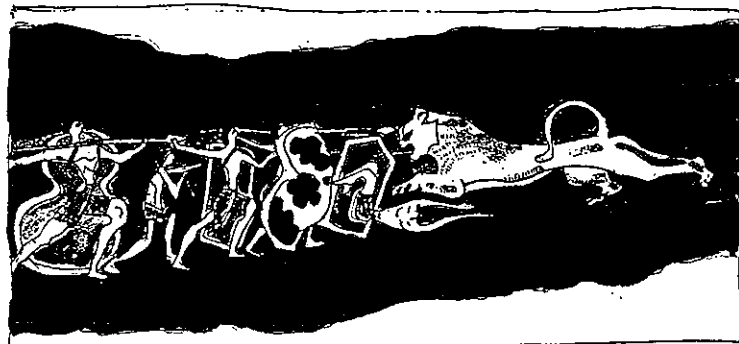
米国立環境衛生科学研究所 生殖発生毒性学部門 分子発生生物学研究室, 室長, 薬学博士.

◇1986年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了, '92年テキサス大学MDアンダーソン癌センター研究員, '98年米国立環境衛生科学研究所生殖発生毒性学部門分子発生生物学研究室室長.

◇研究テーマ: マウスの形態形成をつかさどる遺伝子の機能解析.

◇趣味: ノックアウトマウスつくりと新しい発生工学テクの開発.

ncc00525@nifty.ne.jp



(象眼された銅剣)

X.H

鎮痛の分子生物学的アプローチ

畑 春実, 池田 和隆

(財) 東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・分子精神医学研究部門

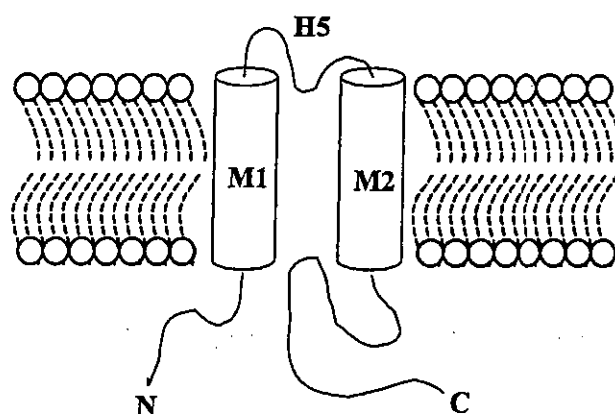
はじめに

医療現場において痛みに対する関心が高まり、患者の苦痛を取り除くペインクリニックが盛んになっている。しかし、治療に伴う副作用が問題になっていることやモルヒネ等の鎮痛薬の治療効果が個人間で大きく異なることから、さらなる「痛み」メカニズムの解明によるペインクリニックの向上が期待される。

近年、分子生物学の応用により、多くの神経伝達物質による情報伝達システムや遺伝子メカニズム等が解明され、疼痛の発生、伝達や鎮痛に関与する新しい分子も次々に発見されてきている。これらの分子生物学的アプローチは疼痛治療の進歩につながると期待される。本稿では、その一例としてアルコールやモルヒネの鎮痛作用におけるGIRKチャンネル(G-protein activated inwardly rectifying potassium channel)開口の重要性と、モルヒネ鎮痛効果の個人差の原因メカニズムについて概説していく。

1. GIRKチャンネルの構造

K^+ (カリウムイオン) を選択的に透過させる膜タンパク質が K^+ チャンネルである。 K^+ チャンネルは膜電位依存性 K^+ チャンネルファミリーと、GIRKチャンネルが属する内向き整流性 K^+ チャンネルファミリーに大別される。内向き整流性 K^+ チャンネルは、 K^+ が内向きに流れやすい特性を有するが、

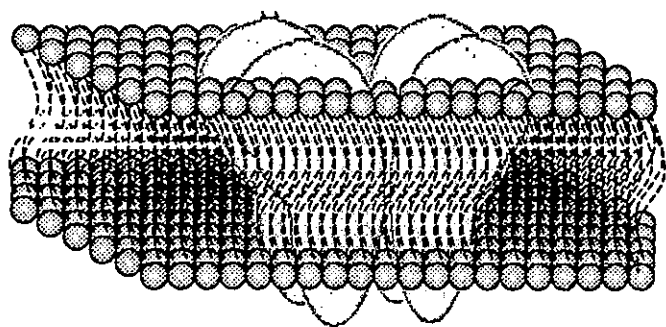
図1 内向き整流性 K^+ チャンネルサブユニットの構造

生理的条件下では細胞内の K^+ 濃度が高いため K^+ を外向きに流し、過分極を引き起こす。構造上の特徴としては、細胞膜を2回貫通し(M1, M2領域)、 K^+ の選択性や透過性を決定しているポア形成部分(H5領域)が存在する(図1)。また、1つのチャンネルは異種または同種の4つのサブユニットで形成され、その集合形式は組織、細胞によって異なる(図2)。例えば脳神経系では、GIRKチャンネルサブユニット(GIRK1~4)のうち、主にGIRK1とGIRK2がヘテロ複合体を形成し機能している。

2. エタノールによるGIRKチャンネルの開口

お酒を飲んだ時に、会話がはずむ、不安感が抑えられる、転倒しても痛みを感じない等の変化を多くの人は経験している。これらの変化は、アル

A Homotetramer



B Heterotetramer

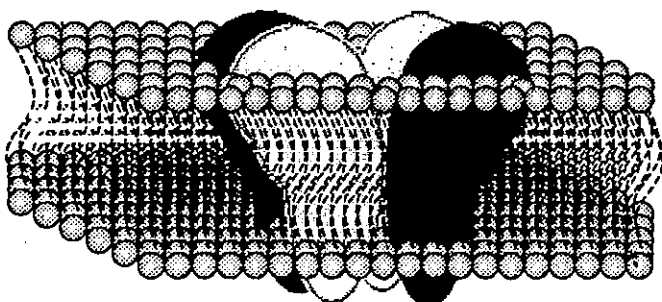


図2 GIRKチャンネルの4量体サブユニットの構造

コール（エタノール）が脳神経系に作用した結果である。しかし、エタノールの作用メカニズムについてはまだ多くの議論があり、検討されるべき点が残されている。

小林らはGIRKチャンネルサブユニットをアフリカツメガエルの卵母細胞に人工的に発現させ、電気生理学的にチャンネルの機能解析を行なった²⁾。図3に示すように、チャンネルを発現させた卵母細胞では、エタノールの接触によりカリウムイオンが流れることが明らかになった。通常GIRKチャンネルは、Gタンパク質共役型受容体刺激によって活性化される。しかし、Gタンパク質阻害剤を投与した条件下でもGIRKチャンネルの開口が認められたことから、アルコールは直接GIRKチャンネルを制御していることが示唆された。

3. モルヒネによるGIRKチャンネルの開口

モルヒネはオピオイドの代表薬物で、ガン患者の疼痛治療等において広く用いられ、患者の痛みの緩和とQOLの向上に重要な役割を果たしている。オピオイドが特異的に結合するオピオイド受容体には μ 、 δ 、 κ の3種類が存在し³⁾、モルヒネはそのうちの主に μ 受容体に作用して鎮痛効果や精神・身体依存を発現させる。

オピオイド受容体を介した細胞内情報伝達系は、主にアデニル酸シクラーゼ系とイオンチャンネル系から構成されている。モルヒネは μ 受容体を刺激することにより、イオンチャンネル系である抑

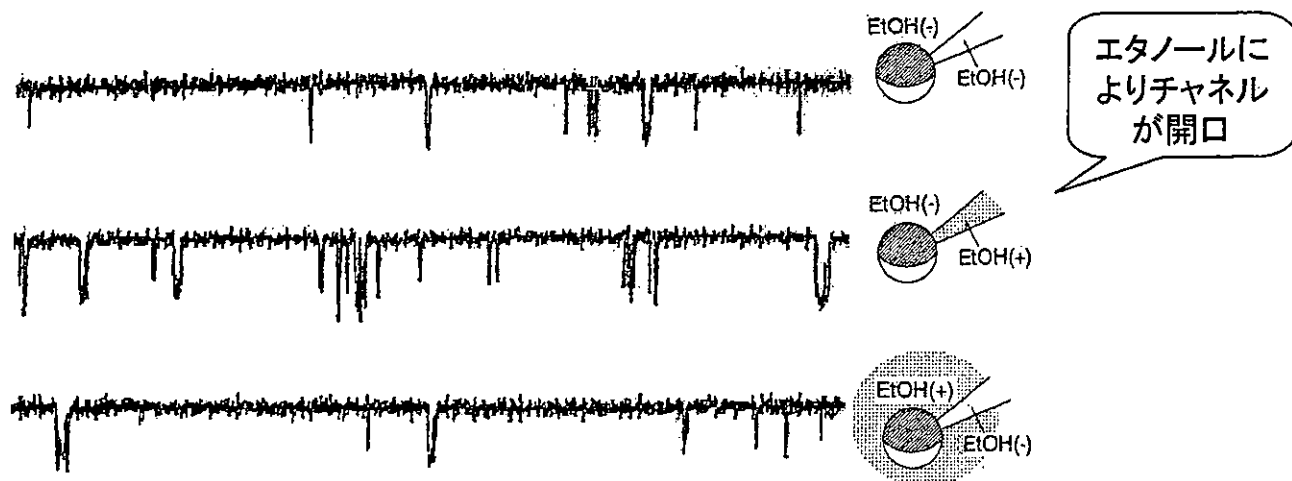


図3 単一チャンネル解析

制性GTP結合タンパク質 (GiあるいはGo) を介したGIRKチャネルの開口を促進させることが明らかにされている⁴⁾。

4. GIRKチャネルと鎮痛効果

ウィーバーミュータントマウス (*wv*) は、先述のGIRK2サブユニットのH5領域に変異を有するマウスで、振戦、痙攣、運動失調等の形質異常が観察される。*wv* のGIRKチャネルは、エタノールによる直接作用やGタンパク質による活性化を受けられないため、*wv* ではエタノールやモルヒネを投与してもGIRKチャネルの開口が不十分である。このマウスを用いて、池田らはエタノールおよびモルヒネによる鎮痛効果を検討した⁵⁾。その結果、エタノールによる体温低下や心拍数低下作用はコントロールマウスと同様に認められたのに対して、鎮痛効果はほとんど認められなかった。このことから、エタノールの鎮痛効果において、GIRKチャネルの開口は重要なメカニズムであると考えられる。また、*wv* ではモルヒネによる鎮痛効果もコントロールマウスと比較して

減弱していたことから (図4)、 μ 受容体作動薬による抑制性Gタンパク質を介したGIRKチャネルの活性化が、モルヒネ鎮痛効果の発現に極めて重要であることが示唆された。このように、異なるGIRKチャネル開口システムを有する2つの薬物と、その標的部位に変異を持つ*wv* を用いることで、分子生物学的、行動薬理学的に1つの鎮痛メカニズムの解明に近づいたと言える。さらには、エタノールのようなGIRKチャネルに直接作用する薬物の開発が、副作用の少ない新たな鎮痛薬誕生の糸口になることも考えられる⁶⁾。

5. モルヒネ鎮痛効果の個人差の分子メカニズム

モルヒネは強力な鎮痛薬である一方、便秘、嘔吐、依存などの副作用を伴うことや鎮痛効果の個人差が大きいことが使用を難しくさせている。そこで、モルヒネに対する感受性差の遺伝的要因を解明するため、池田らはモルヒネの鎮痛効果が減弱しているCXBKマウスに注目し、その遺伝子メカニズムを解析した^{7, 8)}。

CXBKマウスの μ 受容体mRNAの脳内発現量はコントロールマウスに比べて減少していた。また、 μ 受容体mRNAの長さが正常より約2.5kb長いことが明らかにされた。この原因を追究するため、mRNA中のタンパク質に翻訳される領域 (翻訳領域) を解析したところ変異は認められなかった。このことから、CXBKマウスにおける μ 受容体mRNAの長さの違いは非翻訳領域にあると考えられる。非翻訳領域はmRNAの安定性に影響することが知られていることから、CXBKマウスでは、 μ 受容体mRNAが長いために不安定になり、脳内発現量が減少し、モルヒネの鎮痛効果が減弱すると思われる (図5)。さらには、非翻訳領域の多様性は個人差の遺伝的要因の一つである可能性も示唆された。

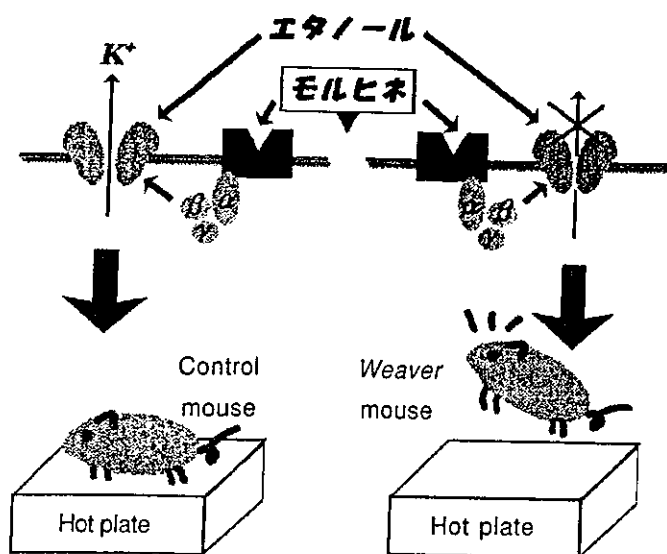


図4 ウィーバーミュータントマウスにおいてエタノールおよびモルヒネ鎮痛効果が減弱するメカニズム

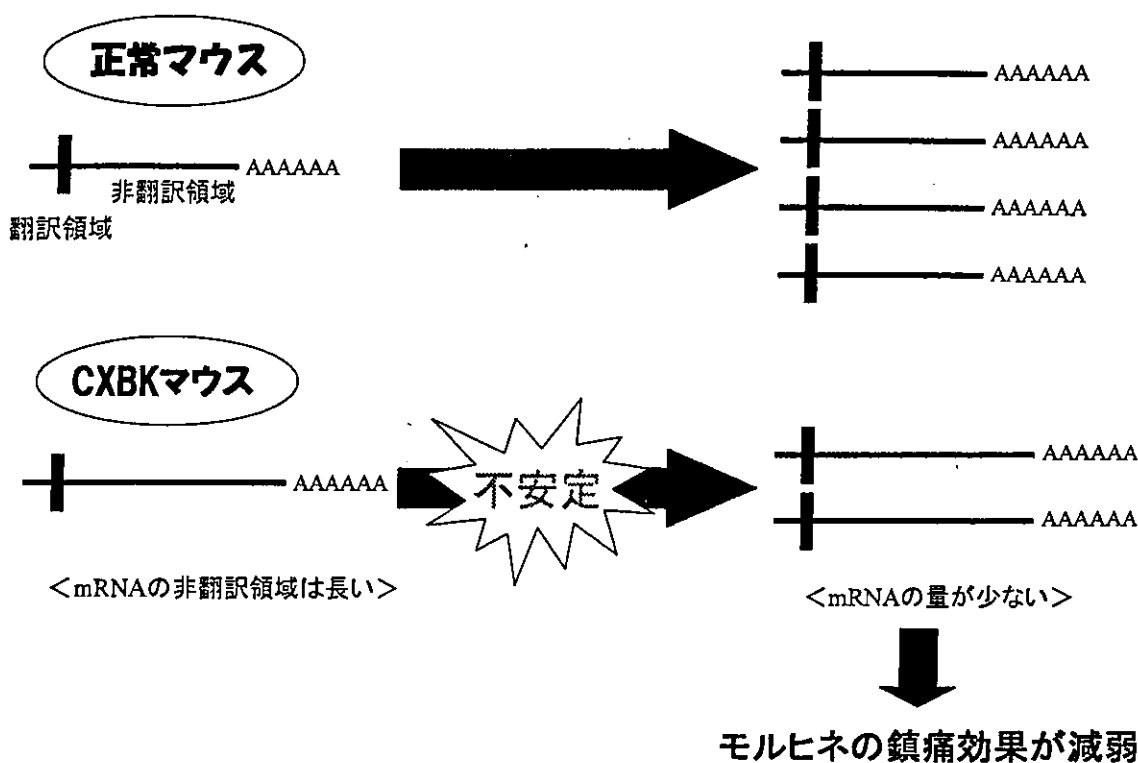


図5 CXBKマウスにおいてモルヒネ鎮痛効果が減弱するメカニズム

おわりに

患者の苦痛を緩和しQOLを向上させるためには、「痛み」と「鎮痛」のメカニズムをさらに解明し、新薬や治療プログラムの開発が必要とされる。今後、分子生物学的研究がさらに成果をあげ、多様な痛みを抱える個々の患者に対してそれぞれ適した治療が行なえるよう期待される。

文献

- 1) Yamada M, Inanobe A and Kurachi Y.: G Protein Regulation of Potassium Ion Channels. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 723-757, 1998.
- 2) Kobayashi T, Ikeda K, Kojima H, et al.: Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Nature Neurosci.*, **2**, 1091-1097, 1999.
- 3) Kieffer, B.L.: Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 19-26, 1999.
- 4) Ikeda K, Kobayashi T, Ichikawa T, et al.: Comparison of the three mouse G-protein-activated K⁺ (GIRK) channels and functional couplings of the opioid receptors with the GIRK1. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **801**, 95-109, 1996.
- 5) Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, et al.: Involvement of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels in opioid-induced analgesia. *Neurosci. Res.*, **38**, 111-114, 2000.
- 6) Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, et al.: Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the key? *Neurosci. Res.*, **44**, 121-131, 2002.
- 7) Ikeda K, Ichikawa T, Kobayashi T, et al.: Unique behavioural phenotypes of recombinant-inbred CXBK mice: partial deficiency of sensitivity to μ - and κ -agonists. *Neurosci. Res.*, **34**, 149-155, 1999.
- 8) Ikeda K, Kobayashi T, Ichikawa T, et al.: The untranslated region of μ -opioid receptor mRNA contributes to reduced opioid sensitivity in CXBK mice. *J. Neurosci.*, **21**, 1334-1339, 2001.

●ニューロサイエンスの仮説●

Hypothesis

快と不快の脳内メカニズムに関する仮説

池田和隆*

はじめに

快と不快は人や動物が行動を決定する上で根本的な役割を担う。ほとんど全ての行動や考えは、快を増やし不快を減らす方向でなされるという考え方もある。何が快なのかという問いは、人類が常に考えてきた課題である。多くの哲学者が取り組み、幸福論を展開してきた。そして未だに科学的に明解な答えは出ていない。人とは何なのか、人は何のために生きるのか、といった哲学的問題に対して自然科学的に取り組む上で、快と不快の解明は一つの王道と言えるであろう。このような人類に課せられた大きな課題の一つである快と不快の理解のために、今までどのような神経科学的研究がなされ、どのような仮説が提唱され、どのような支持や批判を受けているのかを、最近の展開を交えて紹介したい。

I. 快と不快は切り離せるか

1. 脳内自己刺激の発見

大発見は時に偶然の産物である。1954年、マックギル大学の博士研究員だった Olds と大学院生だった Milner は、ラットの中脳網様体に刺激電極を植え込んで覚醒の研究を行っていたとき、電

気刺激をされた場所に戻ってくるラットがいることに気がついた。このラットの脳を調べた結果、刺激電極は中脳網様体からはずっと離れた中核野に誤って植え込まれていたことがわかった。その後、刺激電極を脳の特定の領域に植え込み、動物が自分で刺激できるようにすると、自ら繰り返し刺激することがわかった。脳内自己刺激 (ICSS: Intracranial self-stimulation) による正強化中枢の発見であり、脳の中に快中枢が存在することを示す偉大な研究成果である⁹⁾。脳内自己刺激は、ラット以外の多くの動物で認められ、人でも起こることが報告されている。刺激電極が内側前脳束という神経線維の束にあたっているとき、強い脳内自己刺激が起こる。内側前脳束は外側視床下部を通っているので、この領域に刺激電極を植え込むと、1時間に1万回以上もの脳内自己刺激反応が起こる (図1)。興味深いことに、外側視床下部のすぐ内側にある内側視床下部に刺激電極が植え込まれると、動物はこの電気刺激を嫌がる⁹⁾。これらは、快と不快が別々の中枢を脳内に持ち、それぞれが独立していることを支持する研究結果である。

2. 快情動を引き起こす物質

快と不快が切り離せることを強く支持するもう一つの知見がある。快情動を引き起こす物質が多く知られており、このような物質を摂取すると、不快から脱却することによって快が得られるわけではなく、中立的な情動の状態からでも快情動が単独に発現する¹⁰⁾。人類は5000年以上前から酒を造り、快をエタノールによって人工的に作り出している。ある種のケシに慰安効果があることも古くから知られており、ギリシャ神話にも記載され

Proposed neural mechanisms underlying euphoria and dysphoria.

*財団法人東京都医学研究機構東京都精神医学総合研究所分子精神医学研究部門

[〒156-8585 東京都世田谷区上北沢2-1-8]

Kazutaka Ikeda: Department of Molecular Psychiatry, Tokyo Institute of Psychiatry, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo, 156-8585 Japan.



図1 脳内自己刺激を行っているマウス
内側前脳束（外側視床下部）に刺激電極を植え込み、マウスが床にあいた穴を覗くごとに電気刺激がなされるようにすると、マウスは高頻度に穴を覗いて自分の脳を刺激して快感を得ようとする。

ている。このケシの抽出物がアヘンであり、その主成分はモルヒネである。南米では過酷な気候の中で労働するためにココの実を食べていた。コカインのもとである。覚醒剤（メタアンフェタミンなど）も強い快感を引き起こし、世界に3000万人もの乱用者がいると言われている。その他、マリファナ、ニコチンなど、多くの物質によって快を作り出すことができる。

3. 恒常性維持仮説

苦あれば楽ありとよく言うが、不快があるからこそ快があるとする考え方もある。生きていくためには様々な状況で恒常性を維持する必要がある。例えば空腹の時には食事をしたくなり、寒いときには暖まりたい。このような欲求は恒常性を維持するために備わった機能であると考えることができる。恒常性が保たれていないときに不快であり、保たれるように欲求が生じ、保たれる過程が快であると考えるのである。確かに、空腹が強いつきほど食事はよりおいしく快として感じられる。快情動を引き起こす薬物の場合も、連続して摂取しているとそれが恒常性となり耐性現象が生じて、快情動の発現は起こりにくくなる。さらに、このような状況で薬がなくなれば、今度は大きな不快感が生じる。薬物による快感は単に快を前借りしただけで「つけ」は必ず返さなければい

けないのかもしれない。強いストレス下では痛みを感じにくくなるストレス誘発性鎮痛という現象も知られている。不快が強ければそれ以上の不快は感じにくくなるよう、この場合も恒常性が維持されているようである。生を脅かす現象は不快という警告信号として脳に伝えられ、快とはその不快を取り除く過程に得られるものであり、不快と独立したものではないとも考えられる。このように、確かに快と不快が密接に関連していることは明らかだが、脳内自己刺激や快情動を発現させる薬物の効果を考慮すると、やはりそれぞれ独立した部分を持っていると考える方が優勢であるようである。

II. ドーパミン仮説

1. カテコラミン仮説

内側前脳束に刺激電極が植え込まれていると強い脳内自己刺激が起こる。内側前脳束にはノルアドレナリン神経やドーパミン神経が通っており、6-hydroxydopamine (6-OHDA) によってこれらカテコラミン神経細胞を破壊すると脳内自己刺激が起こらなくなる¹³⁾。また、快情動を引き起こす覚醒剤やコカインは、モノアミンの再取り込みを阻害して遊離モノアミン量を増加させる。これらの実験結果から、カテコラミンが快情動を作り出す分子メカニズムであると考えられた。

2. A10神経

では、ノルアドレナリンとドーパミンのどちらのカテコラミンが快を引き起こすのか。ノルアドレナリン神経の主要な起始核である青斑核を破壊しても脳内自己刺激が消失しないことや、ノルアドレナリン再取り込みを選択的に阻害する薬物には報酬効果がないことから、ノルアドレナリン仮説は否定された。一方、極微小領域を刺激することにより詳細に自己刺激が起こる脳内領域を調べた結果、ドーパミン神経の中のA10神経といわれる中脳被蓋野を起始核として側坐核や前脳皮質に神経線維を伸ばす神経の領域と一致することが明らかとなった。A10神経は、Ungerstedtが組織蛍光法（アミンを蛍光物質に転換させて組織

中の量を調べる方法)を用いて分類したものである¹⁴⁾。A10神経の重要性は、Phillips & Fibiger および Roberts & Koob の実験によって決定的となった^{7,8)}。6-OHDA を腹側被蓋野に局所注入してこの領域のカテコラミン神経細胞のみを破壊すると、脳内自己刺激もコカインの報酬効果も消失した。つまり、脳内自己刺激は A10神経のドーパミン放出を引き起こすことによってドーパミン信号を増強し、コカインは A10神経の終末でドーパミンの再取り込みを阻害することでこの終末でのドーパミン信号を増強して、それぞれ快を発現させると考えられる。Wise は、覚醒剤やコカインだけでなく、ドーパミンシステムに作用する薬物以外の依存性物質 (モルヒネ, エタノール, マリファナなど) も全て A10神経を活性化することで報酬効果を発揮すると考えている¹⁵⁾。Schultz らは、サル A10神経の神経細胞の活動を測定し、報酬を得るときや報酬が期待できるときに、これらの神経細胞が相動 (phasic) して発火することを見つけている⁹⁾。これらの様々な研究から、A10神経は快の中核と考えられている。

3. セロトニンシステムの関わり

セロトニンはノルアドレナリンやドーパミンと同様に、モノアミンであり神経伝達物質である。セロトニンシステムに関しては、うつ病との関係が精力的に研究されているが、最近報酬系との関連で曾良らによる興味深い発見があった¹¹⁾。コカインは3種のモノアミンの全ての再取り込みを阻害するが、その中でドーパミンの再取り込みを阻害することでドーパミン信号を増強することが報酬効果のメカニズムであると考えられていた。しかし、ドーパミンの再取り込み装置を先天的に持たないマウス (ドーパミントランスポーターノックアウトマウス) でもコカインの報酬効果が認められた。さらに、セロトニンの再取り込み装置も同時に持たないマウス (ドーパミントランスポーター・セロトニントランスポーターダブルノックアウトマウス) では、コカインの報酬効果はなかった。ドーパミンシステムが快情動発現において重要な役割を果たすことは明確であるが、セロトニンシステムも少なくともコカインの報酬には関

わると考えられる。

Ⅲ. オピオイドシステムの関わり

1. オピオイドシステムとは

覚醒剤やコカインなどのドーパミンシステムに直接作用する薬物の他にも、強い快情動を引き起こす物質としてオピオイドがある。オピオイドとはモルヒネと類似した作用を持つ物質の総称である。モルヒネやヘロインは脳全体に作用するわけではなく、脳内に極微量存在する標的 (オピオイド受容体) に特異的に作用することが1973年に Snyder らにより示された⁶⁾。その後、モルヒネと類似した薬理作用を持つエンケファリン、エンドルフィンなどのペプチドが脳から単離され、オピオイドシステムが脳内に存在することが明らかとなった³⁾。つまり、モルヒネやヘロインが引き起こす快情動は、脳内でオピオイドペプチドによって自然に引き起こされる快情動と極めて類似したものであると考えられる。オピオイド受容体にはミュー、デルタ、カッパの3種類がある。どれも鎮痛を引き起こす重要な分子であるが、オピオイドの報酬効果はほとんどミューによって担われていることが、ノックアウトマウスを用いた最近の研究から明らかになっている^{4,12)}。

2. オピオイドによるドーパミンシステムの制御

オピオイドはドーパミンシステムを制御することで快情動を引き起こすと考えられている。通常 A10神経は抑制性ニューロンによって活動が抑えられているが、この抑制性ニューロンをオピオイドが抑制することで、脱抑制により A10神経の活動性が上昇するという説である¹³⁾。実際、モルヒネを投与すると側坐核での遊離ドーパミン量が上昇することが知られている。この仮説に立てば、オピオイドが快情動を引き起こすメカニズムは極めてシンプルに理解できる。

3. 独自の快中核である可能性

A10神経の活動性を上げることがオピオイドによる快情動の本質なのであろうか。Belluzzi & Stein はそうは考えていない¹¹⁾。彼らはエンケファ