

情動機構研究チーム

Laboratory for Neurobiology of Emotion

チームリーダー 二木 宏明

NIKI, Hiroaki

情動発現とその異常の脳内メカニズムの解明は、脳研究の重要な課題の1つでありその解明には、分子生物学的手法、神経生理学的手法、組織化学的手法、行動神経科学的手法(行動の実験的分析法)を統合して駆使し、情動発現の神経基盤・物質基盤を多角的に研究することが必要である。

当研究チームでは、遺伝子欠失マウス(Fyn チロシンリン酸化酵素欠失マウス, NMDA 受容体サブユニット欠損マウス)の行動異常(情動行動の異常)と、その神経生理学的、生化学的基盤を明らかにするとともに、他方では、分子生物学的手法、神経化学的手法、組織化学的手法を用いて、聴覚性痙攣のメカニズム、神経可塑性と情動記憶の分子機序、快情動の分子機序についても研究を行い、情動の分子生物学的機序の解明をめざしている。

1. 遺伝子欠失マウスの行動異常と薬理学的・生理学的基盤(広中, 八木, 坂本, 二木)

Fyn 欠失マウスの行動異常に関しては、恐怖反応の亢進、痙攣の感受性の亢進、エタノール感受性の亢進などを明らかにした。マウスやラットでは、恐怖を誘発する強い照明下では音に対する驚愕反応が増強する現象(light potentiated startle)が知られているが、Fyn 欠失マウスは、対照群が光による驚愕反応の増強を起こさない程度の照明条件でも驚愕反応の増強が見られ、Fyn 欠失による恐怖反応の亢進の新たな証拠が得られた。さらにマイクロダイアリシスを用いて前頭前野、海馬、及び線条体におけるセロトニンとドパミンの遊離を測定したところ、光照射によってFyn 欠失マウスでは前頭前野のセロトニンとドパミン、海馬のセロトニン遊離が亢進することが明らかになった。Fyn 欠失マウスの情動行動の異常についてさらに検討する目的で強制水泳テストを行った。このテストではFyn 欠失マウスの無動傾向が対照群に比べて小さいことを見いだした。現在、マイクロダイアリシスを用いてその神経化学的基盤を調べているところである。

NMDA 受容体サブユニット 2A 遺伝子欠損マウスに関しては、下丘の電気刺激で聴覚痙攣様痙攣を誘発する実験を行い、NR2A 遺伝子欠損マウスでは対照の野生型に比べて、聴覚痙攣誘発閾値が高いという予備的な結果を得ている。

2. 聴覚痙攣のメカニズム(甲斐, 広中, 坂本, 二木)

(1) 聴覚性痙攣のプライミングに関する薬理学的基盤(広中, 二木)

NMDA 受容体 NR2A, 2B の拮抗剤を用いて聴覚痙攣におけるこれら2つのNMDA 受容体サブユニットの機能的役割を分離するのに成功した。

(2) 聴覚性痙攣のプライミングに関する分子生物学的基盤(甲斐, 二木)

聴覚性痙攣のプライミングに伴う遺伝子発現の変化が聴覚経路(蝸牛核, 下丘, 上丘深層)のどの部位で起こっているかを明らかにするため、生後21日に120dBの大きな音を聞かせてプライミングを行い、1週間後、2週間後に純音(16kHz)に対するc-Fosの発現を、プライミングを行わない対照のマウスと比較した。プライミングを行ったマウスは対照群に比べて、下丘ではFos陽性細胞の数が著しく増加していたが、蝸牛核や上丘深層では差がなかった。現在、このようなプライミングに伴う下丘のExcitabilityの亢進に関連する種々な受容体の変化について検討中である。

(3) 聴覚性痙攣プライミングに関する行動神経科学的基盤(坂本, 二木)

マウスの下丘を電気刺激すると音で誘発したのと同様な痙攣(wild running, clonic-tonic seizure)が生ずることが知られている。そこで、プライミングによって下丘の電気刺激による痙攣誘発閾値が低下するか否かを調べたところ、プライミングを行ったマウスでは痙攣誘発閾値が低いことが見いだされた。一方、聴覚痙攣の神経回路で下丘の次の出力先である上丘深層では、プライミングを行わない対照群との間に痙攣誘発閾値に差がなかった。この刺激実験の結果は先に述べた我々のFos発現を指標とした免疫組織化学の実験結果と一致するものである。

3. 神経可塑性および情動記憶の分子機序(児島, 二木)

(1) Fynの神経可塑性および情動記憶における役割に関する研究

Fynが恐怖の情動発現と維持に関与しているかどうかをFynミュータントマウスを用いて恐怖条件づけテストにより検討し、野生型と比べFyn過剰発現マウスでは恐怖条件づけ後の恐怖反応が低いという予備の結果を得ている。Fynの主要なチロシンリン酸化基質にはNMDA受容体2Bが含まれており、Fynはこの受容体の機能的変化を通して情動発現とその記憶保持に関わっている可能性がある。

(2) 神経可塑性および情動記憶における遺伝子発現変化の解析

神経可塑性の実験モデルであるキンドリングで脳内において発現変化する遺伝子を検索し、ICERと呼ばれる転写因子が扁桃体の電気刺激後に脳内で一過性に増加することを見いだした。そこで、ICERの情動発現や情動記憶における役割を知る一助として恐怖条件づけにおけるICER発現の変化を調べたところ、ICERが扁桃体で増加すると結果を得た。したがってICERは電気刺激のみならず脳内の神経活動の賦活によって増加すると考えられる。ICERはCREB/ATFファミリーに属する他の転写活性化因子を抑制することが知られており、神経活動の活性化に伴って発現誘導される他の遺伝子の発現抑制に関わっている可能性

がある。この仮説を検証するために、現在、ICER のノックアウトマウスと過剰発現マウスの作製を試みている。

恐怖条件づけ後には扁桃体において遺伝子発現がダイナミックに調節されており、これらが条件づけ記憶の長期保持に関わっている可能性がある。そこで現在、条件づけしたマウスの扁桃体で発現変化する遺伝子を GeneChip により系統的に検索している。

4. 快・不快情動の分子機序

(1) 脳内自己刺激反応を引き起こす分子機序(池田, 曾良, 二木)

脳内報酬系がどのような分子機序で機能しているのかを明らかにするため、モルヒネの脳内標的であるミューオピオイド受容体およびコカインの脳内標的であるドパミン輸送体のそれぞれの遺伝子欠損マウスを用いて、脳内自己刺激反応テストを行っている。本年度は、ヘッドディッピング方式と滞在方式の2種の異なるテスト法でマウスの脳内自己刺激行動を総合的に解析するシステムを確立した。また、それぞれの遺伝子欠損マウスが野生型のマウスとは異なる脳内自己刺激反応を示すという予備的な結果を得た。

(2) オピオイド鎮痛薬の分子作用機序(池田, 二木)

オピオイドによる鎮痛の分子メカニズムを明らかにするため、本年度は G タンパク質活性化型内向き整流性カリウムチャネル(GIRKチャネル)に異常のあるウィーバーミュータントマウスを用いて、薬理学的実験を行った。ミューオピオイド作動薬(モルヒネ)およびカッパオピオイド受容体作動薬(U50488)の鎮痛効果は、ウィーバーミュータントマウスにおいて有意に減弱していることが明らかになった。この知見は、オピオイド鎮痛においては、GIRKチャネルを介した細胞内情報伝達経路が重要であることを示している。

また、モルヒネ鎮痛効果が減弱していることで知られる CXBK マウスの遺伝的原因を明らかにした。CXBK マウスのミューオピオイド受容体メッセンジャー RNA は、正常な翻訳領域を有するが、非翻訳領域が異常に長く、発現量が減少していることが明らかになった。さらに、このメッセンジャー RNA の異常が、ミューオピオイド受容体遺伝子の異常に由来すること、および CXBK マウスでの減弱したモルヒネ鎮痛の原因となることを明らかにした。ミューオピオイド受容体メッセンジャー RNA の非翻訳領域が異なるためにオピオイド鎮痛に差異が生じる可能性が考えられ、オピオイド鎮痛における遺伝的個人差のメカニズムの1つとして今後詳細に検討する予定である。

(3) 精神作用を有する薬物の分子作用機序(池田, 二木; 矢野(細胞内情報研究チーム))

ハロペリドール、クロロプロマジン、クロザピンなどの向精神薬は情動に大きな影響を与えることが知られている。これらの薬物の作用機序を明らかにすることは、情動の発現メカニズムを知る上でも重要であると考えられる。

本年度はハロペリドール、クロザピン、ピモザイドなどの向精神薬が GIRK チャネルに対して抑制的に作用することを明らかにした。今後は、解析が不十分な内在性オピオイドリガンドの作用機序をクローン化したミュー、デルタ、カッパオピオイド受容体 cDNA を用いて解析する。(新潟大学脳研究所分子神経病理学部門との共同研究)

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Ishibashi H., Kojima N., and Obata K.: "Decreased locomotor activity in mice carrying transgenic Fyn tyrosin kinase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 707-709 (2000). *

Kobayashi T., Ikeda K., and Kumanishi T.: "Inhibition by various antipsychotic drugs of the G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels expressed in *Xenopus* oocytes", *Br. J. Pharmacol.* **129**, 1716-1722 (2000). *

Ikeda K., Kobayashi T., Ichikawa T., Kumanishi T., Niki H., and Yano R.: "The untranslated region of μ -opioid receptor mRNA contributes to reduced opioid sensitivity in CXBK mice", *J. Neurosci.* **21**, 1334-1339 (2001). *

Koide T., Moriwaki A., Ikeda K., Niki H., and Shiroishi T.: "Multi-phenotype behavioral characterization of inbred strains derived from wild stocks of *Mus musculus*", *Mamm. Genome* **11**, 664-670 (2000). *

Hironaka N. and Niki H.: "Effects of *N*-methyl-D-aspartate receptor subunit antagonists on regulation of susceptibility to audiogenic seizures in rats", *Neurosci. Lett.* **288**, 139-142 (2000). *

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.* **38**, 113-116 (2000). *

(総説)

池田和隆, 小林徹: "アルコールの新たな生体内標的チャネル: エタノールが GIRK チャネルを直接開口する", *化学と生物* **38**, 640-642 (2000).

二木宏明: "記憶と情動: 遺伝子欠陥マウスの研究からの挑戦: 遺伝子欠陥マウスの研究からの挑戦", *日本臨床麻酔学会誌* **20**, 1-6 (2000).

(単行本)

池田和隆: "第5章 4. ペプチド", *脳神経科学イラストレイテッド*, 森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛(編), 羊土社, 東京, pp. 193-198 (2000).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Sakamoto T. and Okaichi H.: "The solving of the place or cue task in medial caudate-putamen lesioned rats", 27th Int. Congr. of Psychology, (Stockholm Convention Bureau), Stockholm, Sweden, July (2000).

Hironaka N. and Niki H.: "Differential role of NMDA receptor 2A and 2B subunits in audiogenic seizure in rats", 27th Int. Congr. of Psychology, (Stockholm Convention Bureau), Stockholm, Sweden, July (2000).

Ozaki M., Hashikawa T., Miyakawa Y., Kishida H., Ikeda K., Ichikawa T., Kumanishi T., Ishihara Y., and Yano R.: "Involvement of pontocerebellar mossy fibers in the development of cerebellar cortex revealed by analyzing weaver mutant mouse", 30th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Ikeda K., Ichikawa T., Kobayashi T., Kumanishi T., Niki H., and Yano R.: "The untranslated region of mu-opioid-receptor mRNA contributes to reduced opioid sensitivity in CXBK mice", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

(国内会議)

坂本敏郎, 二木宏明: "下丘の電気刺激によるマウスの聴覚痙攣と幼児期プライミング効果", 日本動物心理学会第60回大会, 東京, 6月(2000).

坂本敏郎, 二木宏明: "マウス中脳聴覚部位刺激による聴覚痙攣: 幼児期騒音呈示の効果", 第23回日本神経科学大会, 横浜, 9月(2000).

小林徹, 池田和隆, 小島比呂志, 二木宏明, 矢野良治, 吉岡亨, 熊西敏郎: "アルコールの新たな生体内標的: GIRKチャンネル", 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9月(2000).

児島伸彦, 坂本敏郎, 二木宏明: "恐怖条件づけに伴う扁桃体における遺伝子発現変化", 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9月(2000).

甲斐信行: "純音に対する下丘 c-Fos 発現に及ぼす幼若期騒音呈示の効果", 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9月(2000).

池田和隆, 小林徹, 市川富夫, 熊西敏郎, 矢野良治, 二木宏明: "鎮痛における GIRK チャンネルの役割", 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会合同大会, 横浜, 9月(2000).

廣中直行: "Fyn 遺伝子ノックアウトマウスにおける光刺激による驚愕反応の増強と前頭前野のモノアミン遊離", 第30回日本神経精神薬理学会, 仙台, 10月(2000).

二木宏明: "情動と記憶の機能相関", 第78回日本生理学会大会シンポジウム, 京都, 3月(2001).

児島伸彦, 二木宏明: "情動記憶の固定化に関わる分子の探索", 第78回日本生理学会大会シンポジウム, 京都, 3月(2001).

1. Studies on Behavioral Disorders of Knockout Mice and Their Neurochemical and Neurophysiological Correlates
2. Mechanisms of Audiogenic Seizure
3. Mechanisms of Neuronal Plasticity and Emotional Memory
4. Molecular Mechanisms of Pleasant and Unpleasant Feelings

Laboratory Head

Dr. Hiroaki NIKI

Research Scientists

Dr. Naoyuki HIRONAKA

Dr. Nobuhiko KOJIMA

Dr. Kazutaka IKEDA

Dr. Nobuyuki KAI

Dr. Toshiro SAKAMOTO

Technical Staffs

Ms. Rie HARUKUNI

Ms. Sachiko MAKINO

Ms. Naomi YAMAZAKI

Mr. Masayuki INADA

Assistants

Ms. Miyuki IKEDA

Part time Reserchers

Dr. Takeshi YAGI (Osaka Univ.)

Dr. Ichiro SORA (Tokyo Inst. Psychiatry)

Dr. Shigeki YUASA (Chiba Univ.)

Dr. Mitsunobu YOSHII (Tokyo Inst. Psychiatry)

Dr. Yasuhiro OKADA

Dr. Kazutaka IKEDA (Tokyo Inst. Psychiatry)

Research Subjects and Members of Laboratory for Neurobiology of Emotion