

熊本大学学位論文

Girk2 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス作製と表現型解析:

チペピジンの画期的治療薬としての開発を目指して

2018

熊本大学大学院薬学教育部 創薬・生命薬科学専攻

バイオフィーマコース 環境分子保健学分野

本多 幾多郎

Preparation of *Girk2* gene conditional knockout mice and their phenotype analysis

- aiming at development as a breakthrough therapeutic drug for tipegidine

Department of Environmental and molecular Health Science,
Graduate School of Pharmaceutical Science, Kumamoto University

Ikutaro Honda

Girk2 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス作製と表現型解析:
チペピジンの画期的治療薬としての開発を目指して

創薬・生命薬科学専攻 バイオフィーマコース 環境分子保健学分野 本多 幾多郎

現代社会における医療上最も重要な課題の一つは、急増する精神疾患への対策である。

本研究室では、これまでにチペピジンをはじめとした非麻薬性中枢性鎮咳薬が、1) GIRK チャンネル活性化電流を抑制すること、2) 脳内モノアミンレベルを上昇させること、3) 鎮咳有効量という一定の用量帯域において、うつ病をはじめとした様々な原因の異なる難治性中枢疾患モデル動物の症状を改善することを明らかにしてきた。さらに、薬理学的研究は、これらの改善作用のいくつかは、脳内の GIRK チャンネルの抑制を介したドパミン D₁ 受容体の活性化によりもたらされることを明らかにしてきた。これらの知見を踏まえると、中枢性鎮咳薬は中脳辺縁系のドパミンニューロンにおける GIRK チャンネルを重要な作用点として中枢機能を改善していることが十分に考えられる。しかし、抗うつ様作用を含む多彩な薬理作用に GIRK チャンネルが関わっていることを示す直接的な証拠はない。そこで、チペピジンの抗うつ様作用への GIRK チャンネルの関与を実証するために、さらには GIRK チャンネルの脳における生理学的役割を追究する糸口を得ることを目的として、まず第一に、脳の広い領域に亘り発現し、さらには中脳辺縁系において最も高発現が認められている GIRK2 を標的とし、Cre-loxP システムを用いた *Girk2* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの作製に取り組んだ。第二に、このマウスの表現型を神経化学的、電気生理学的、および行動学的手法を用いて解析した。

予てより本研究室において作製された、GIRK2 をコードする遺伝子である *Girk2/Kenj6* に対する floxed *Girk2* マウス作製のためのターゲティングベクターを使用した。エレクトロポレーション法によってこのベクターを導入し、ES 細胞のコロニーを 1176 個ピックアップし PCR 法とサザンブロット法によりスクリーニングした。その結果、相同組換え体クローンの検出には至らなかった。そこで、近年ゲノム編集領域において注目を集めている、CRISPR/Cas システムを用いた検討を行った。標的 exon の両端のアームを認識し nick を導入する D10A 変異体 Cas9 発現ベクターを ES 細胞にターゲティングベクターと同時導入し 72 個のクローンの解析を行った結果、7 個の組換え体クローンを作製することに成功した。さらに、これらのうち 2 個のクローンにおいて、*neo* 遺伝子の抜き取りを行い、5 つのキメラマウスのサブライン、および loxP 挿入マウス (GIRK2^{floxed} マウス) の樹立に成功した。

1. GIRK2^{nes}KO マウスでの検討

GIRK2^{floxed} マウスと脳特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Nestin-Cre トランスジ

ェニックマウスを交配することにより、GIRK2^{nesKO} (*Girk2*^{flxed/flxed}; Tg (Nestin-Cre)) マウスを作製した。

- RT-PCR 法により、GIRK2^{nesKO} マウスの脳において顕著に GIRK2 の mRNA レベルが減少していることを確認した。
- 免疫組織化学的手法により、GIRK2 の高発現が認められる中脳辺縁系や青斑核において、GIRK2 が欠損していることを確認した。
- 行動薬理的検討において GIRK2^{nesKO} マウスは強制水泳試験において無動時間を短縮させた。一方でオープンフィールド試験において自発運動量に有意な変化はなかった。

2. GIRK2^{DATKO} マウスでの検討

GIRK2^{flxed} マウスとドパミントランスポーター (DAT) のプロモーターの下流で Cre リコンビナーゼを発現するマウスである DAT-Cre トランスジェニックマウスと交配させることにより、GIRK2^{DATKO} (*Girk2*^{flxed/flxed}; Tg (DAT-Cre)) マウスを作製した。

- 免疫組織化学的手法で検討した結果、GIRK2^{DATKO} マウスの腹側被蓋野および黒質領域において、カテコールアミン神経のマーカである tyrosine hydroxylase (TH) と GIRK2 の共局在が認められなかった。
- 電気生理学的手法により、GIRK2^{DATKO} マウスの腹側被蓋野より急性単離したドパミンニューロンにおいて、ステップパルスを与えた際に観察される I_h 電流およびグルタミン酸を投与した際に観察される内向き電流は、GIRK2^{flxed} マウスの同じ部位から単離したドパミンニューロンで見られるそれぞれの電流と変わりなかったが、ドパミンおよび GABA_B 受容体アゴニストであるバクロフェンに対しては、GIRK2^{flxed} マウスからのニューロンと異なり、応答を示さなかった。
- 行動薬理的検討において、GIRK2^{DATKO} マウスは強制水泳試験において無動時間の短縮を示した。一方でオープンフィールド試験において自発運動量に有意な変化は認められなかった。

本研究において、GIRK2^{flxed} マウスの樹立に成功した。さらに、本研究は中枢における GIRK2 サブユニットを含む GIRK チャンネルがうつ様行動に関与することを明らかにし、さらにドパミンニューロンに限局した GIRK チャンネルがうつ様行動に重要な役割をもつことを明らかにした。本研究結果は、本分野で得られている GIRK チャンネル抑制作用をもつチペピジンなどの中枢性鎮咳薬との結果と一致しており、これらの薬物の作用点解明の一助となることが示唆され、GIRK チャンネル研究および新規の中枢疾患治療薬開発の発展に資する知見であると考えられる。

Preparation of *Girk2* gene conditional knockout mice and their phenotype analysis -
aiming at development as a breakthrough therapeutic drug for tipepidine

Department of Environmental and molecular Health Science,
Graduate School of Pharmaceutical Science, Kumamoto University

Ikutaro Honda

One of the most important medical issues that should be dissolved in modern society is countermeasures for rapidly increasing mental diseases.

A series of studies carried out in our laboratory revealed that centrally acting antitussives (such as tipepidine) 1) inhibit G-protein-coupled inwardly rectifying potassium (GIRK) channel currents, 2) increase the levels of monoamines released in some brain region, 3) ameliorate the symptoms of various intractable disease models (e.g. depression) at antitussive effective doses. Further pharmacological studies suggested that their effects of the drugs may be caused by activation of dopamine D₁ receptor through inhibition of GIRK channels in the brain. However, there has been no direct evidence that GIRK channels are involved in the multiplex pharmacological action including antidepressant-like effect. To demonstrate an involvement of GIRK channels in antidepressant-like effect of tipepidine, and further to get a clue for studying a physiological significance of GIRK channels in the brain, at first, I tried to generate *Girk2* conditional knockout mice. Secondly, I analyzed the phenotype of the mice with neurochemical, electrophysiological and behavioral techniques.

In previous study, our laboratory constructed the targeting vector of *Girk2/Kcnj6* coding GIRK2 protein for floxed mice. By PCR and southern blotting, 1176 colonies of ES cells were analyzed for homologous recombination. However, we could not identify recombinant ES clone. In order to increase efficiency of homologous recombination, we employed the CRISPR/Cas system. We further used a Cas9 nickase known as Cas9 D10A. After co-electroporation of the targeting vector and Cas9 D10A expression vectors, seven recombinant ES clones were detected by PCR and southern blotting analysis out of 72 clones. After the neomycin-resistant cassette of the targeted ES clones was removed, chimeric mice were produced with these clones and successfully established GIRK2^{floxed} mice.

1. Investigation on GIRK2^{nes}KO mice

By crossing GIRK2^{flox} mice with transgenic mice (Nestin-Cre), we obtained *Girk2*^{flox/flox}; Tg(Nestin-Cre) (hereafter, GIRK2^{nes}KO) mice.

- In GIRK2^{nes}KO mice, *Girk2* mRNA was remarkably decreased in the brain.
- In immunohistochemical study, the signals expressing GIRK2 were disappeared in the mesolimbic and locus coeruleus neurons of GIRK2^{nes}KO mice.
- In the forced swimming test, GIRK2^{nes}KO mice showed the reduced immobility time. On the other hand, locomotor activity of the GIRK2^{nes}KO mice was not changed compared to that of GIRK2^{flox} mice in the open field test.

2. Investigation on GIRK2^{DAT}KO mice

By crossing GIRK2^{flox} mice with transgenic mice (DAT-Cre), we obtained *Girk2*^{flox/flox}; Tg (DAT-Cre) (hereafter, GIRK2^{DAT}KO) mice.

- In immunohistochemical study, GIRK2 and tyrosine hydroxylase double positive cells were extinguished in the mesolimbic neurons of GIRK2^{DAT}KO mice.
- In electrophysiological study, dopamine neurons from ventral tegmental area (VTA) of GIRK2^{DAT}KO mice showed the same level as the currents induced by step pulse and glutamic acid compared to one from GIRK2^{flox} mice. On the other hand, electrophysiological responses to dopamine and baclofen did not occur in dopamine neurons from VTA of GIRK2^{DAT}KO mice.
- GIRK2^{DAT}KO mice revealed the reduced immobility time in the forced swimming test. On the other hand, the locomotor activity of GIRK2^{DAT}KO mice was not changed compared to that of GIRK2^{flox} mice in the open field test.

In this study, I newly established GIRK2^{flox} mice line. In addition, I found that the GIRK channels containing GIRK2 subunit may be involved into depression-related behaviors. The results obtained from the present study are consistent with those obtained from previous our studies. Therefore, the present results suggest that the anti-depressant-like effect of antitussives such as tipepidine in mice may be caused at least partly by activation of the dopamine neurons through an inhibitory action on GIRK channels in the VTA. Taken all together, the present results may contribute to development of research on the physiological role of GIRK channels in the brain and of innovative novel medicines for intractable brain diseases in the future.

略語表

本論文では以下の略語を使用する.

5-HT : 5-Hydroxytryptamine

ADHD : attention-deficient hyperactivity disorder

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

Cas : CRISPR associated proteins

CRISPR : clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

DAT : dopamine transporter

DEPC : diethyl pyrocarbonate

DNA : deoxyribonucleic acid

DSB : double-strand break

DT-A : diphtheria toxin A chain

EDTA : ethylenediamine tetraacetic acid

ES : embryonic stem

GABA : gamma-amino-butyrac acid

GDP : guanosine diphosphate

GIRK : G protein-coupled inwardly rectifying potassium channel

GPCR : G protein-coupled receptor

GTP : guanosine triphosphate

IRES : internal ribosomal entry site

KO : knock out

LC : locus coeruleus

MAO : monoamine oxidases

mRNA : messenger ribonucleic acid

NAc : nucleus accumbens

NEO : neomycin resistant gene

NHEJ : non-homologous end joining

PBS : phosphate buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PGK : phosphoglycerate kinase promoter

RNA : ribonucleic acid

RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SDS : sodium dodecyl sulfate

SN : substantia nigra

SNRI : serotonin noradrenaline reuptake inhibitor

SSRI : selective serotonin reuptake inhibitor

TH : tyrosine hydroxylase

Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

UV : ultra violet

VTA : ventral tegmental area

本論文は、学術論文に掲載された次の論文を基礎とするものである。

1. Deletion of GIRK2 subunit containing GIRK channels of neurons expressing dopamine transporter decrease immobility time on forced swimming in mice. *Neurosci. Lett.*, **665**,140-146 (2018).
Honda I, Araki K, Honda S, Soeda F, Shin MC, Misumi S, Yamamura KI, Takahama K.

目 次

第1章	緒 論	1
第2章	<i>Girk2</i> 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの作製	5
第1節	本章の目的	5
第2節	実験成績	6
第1項	<i>Girk2</i> コンディショナルノックアウトマウス作製の流れ	6
第2項	本研究室におけるこれまでの試み	7
第3項	本研究における遺伝子組換え ES 細胞の単離, スクリーニング	11
第4項	CRISPR / Cas システムを用いた, ES 細胞の単離, スクリーニング	15
第5項	キメラマウスおよび <i>Girk2/Kcnj6</i> ^{floxed/floxed} マウスの作製	22
第3節	考察	24
第3章	GIRK2 ^{nes} KO マウスの作製及び表現型解析	26
第1節	本章の目的	26
第2節	実験成績	
第1項	GIRK2 ^{nes} KO マウス作製	27
第2項	GIRK2 ^{nes} KO マウスの免疫組織化学的解析	29
第3項	GIRK2 ^{nes} KO マウスの行動薬理的解析	31
第3節	考察	32
第4章	GIRK2 ^{DAT} KO マウスの作製および表現型解析	34
第1節	本章の目的	34
第2節	実験成績	35
第1項	GIRK2 ^{DAT} KO マウス作製	35
第2項	GIRK2 ^{DAT} KO マウスの免疫組織化学的解析	37
第3項	GIRK2 ^{DAT} KO マウスの急性単離腹側被蓋野ニューロンに対する 電気生理学的解析	39
第4項	GIRK2 ^{DAT} KO マウスの行動薬理的解析	42
第5項	GIRK2 ^{DAT} KO マウスの各脳領域における ドパミン量の定量	44
第3節	考察	45
第5章	総 括	48
	実験の部	52
	謝 辞	66
	参考文献	68

第1章 緒論

急増する精神疾患への対策は、現代社会における最も重要な課題の一つである。

近年、本邦におけるうつ病を含む気分障害の患者数は著しく増加しており、1999年には44.1万人であった患者数は、わずか15年後の2014年には111.6万人に急増している¹⁾。精神疾患全般においても、その数は、2014年に392.4万人と推定されている。この事態を重く見た厚生労働省は、2013年度の医療計画より「四大疾病」に精神疾患を追加し「五大疾病」とした。また、この問題は本邦だけにとどまらず、世界保健機関の世界精神保健調査によると、うつ病は2030年には、健康な生活に支障をきたす指標となる疾病負荷で第1位の疾患になると予測しており、世界的に重大な問題である。

うつ病の薬物療法と精神神経薬理の始まりは、抗結核薬イプロニアジドからの偶然の抗うつ様作用の発見といわれるが、それ以降、モノアミントランスポーターやモノアミン酸化酵素(MAO)を阻害する薬物が多く生み出され、現在では、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)もしくはセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI)が第一選択薬として使用される。しかしながら、これらの薬物は約30~40%の患者には治療効果を示さないと報告され、さらに服薬開始から治療効果を発現するまでに4週間程度かかるといった問題点がある²⁾。うつ病は多くの因子が複雑に関連するヘテロな病態であるが、薬物選択の手助けとなるクリティカルなバイオマーカーさえ存在しないのが現状である。また、既存の抗うつ薬は自殺関連行為の増加に繋がる賦活症候群をはじめ、傾眠、消化管障害、性機能障害など多くの副作用を有し、薬物治療の継続が難しくなっている³⁾。従って、(1)治療抵抗性うつ病に対して抗うつ様作用(これまでと異なるメカニズム)を有し、(2)作用の発現が早く、(3)副作用の少ない治療薬の開発が望まれている。

チペピジンは、本邦において1959年に非麻薬性の鎮咳去痰薬として認可された薬物であり、現在でも小児領域をはじめとして使用される安全性の高い薬である。近年、当分野の基礎知見を基に行われた、医師指導の非盲検試験において、チペピジンは小児の注意欠如多動症(ADHD)患者^{4,5)}、青年期うつ病患者⁶⁾、そして治療抵抗性うつ病患者⁷⁾の症状を改善した。これは、新薬開発が難航を極める現代において画期的な知見である一方で、裏を返すと、特に安全性が必要とされる小児領域で使用している薬物においてすら、その作用の全容は明らかになっていなかったということである。

当分野、高濱らは長年における鎮咳薬の研究過程において、このチペピジンを含む非麻薬性中枢性鎮咳薬が、脳急性単離ニューロンにおいて、共通してGタンパク質共役型内向き整流性K⁺(G protein-coupled inwardly rectifying potassium: GIRK)チャネル活性化電流を抑制すること⁸⁻¹⁰⁾を見出した。GIRKチャネルはGIRK1~GIRK4のいずれかのサブユニットが四つ集合したホモマーあるいはアイソマーとして存在し、5-HT_{1A}¹¹⁾、アドレナリン α_2 ¹²⁾、ドパミンD₂¹³⁾、ムスカリンM₂^{14,15)}、GABA_B¹⁶⁾、代謝型グルタミン酸mGluR¹⁷⁾、 μ -、 κ -、 δ -オピオイド¹⁸⁾受容体など、様々なGタンパク質共役型受容体と共役している。

GIRK チャネルは、共役する GPCR へのリガンドの結合により、G タンパク質の α サブユニットに結合している GDP がリン酸化され、GTP となることで、同サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニット複合体の解離が起こり、その解離された $\beta\gamma$ サブユニットにより直接活性化される (Fig.1).

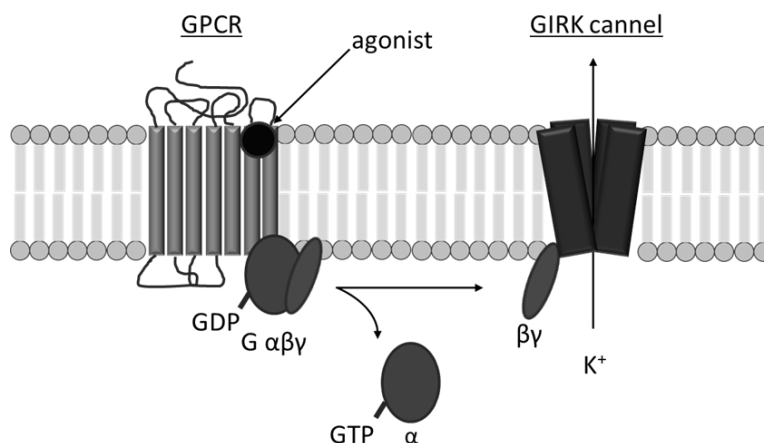


Fig. 1 GIRK channels are activated upon GPCR stimulation by direct interaction with G $\beta\gamma$.

この GIRK チャネルは脳内に広く発現しており、神経細胞の興奮性の制御に重要な役割を果たしている^{19,20}。したがって、GIRK チャネルの抑制は、神経細胞の興奮性を高め、それぞれの神経伝達物質の遊離を促進することが予想される。実際に当分野においては、GIRK チャネル抑制作用をもつ中枢性鎮咳薬が脳の様々な領域において、*in vivo* マイクロダイアリシス法によりドパミン、セロトニンをはじめとする脳内モノアミンレベルを上昇させることを報告している²¹⁻²³。さらに、これらの薬物は、1) 下記に示すような、原因の異なる様々な難治性病態モデルに対して、鎮咳有効量という一定の用量帯域で改善効果をもつことを報告してきたこと (Table 1)²⁴⁻³⁵、2) 鎮咳作用や多動抑制作用などの作用強度と GIRK チャネル抑制作用の強度が相関しているという事実より、これらの作用メカニズムの一端を GIRK チャネル抑制作用が担っていることは十分に予想される。そして、中枢性鎮咳薬が、“多動”と“うつ病”、“排尿困難と過活動膀胱”という相反する症状の両方に改善作用を示すことから、高濱らは“GIRK チャネルの抑制は生体の修復機構を高め、脳機能を安定化させる”との作業仮説を立てた。実際に Table1 に示した鎮咳薬が奏功した疾患は、これまでのところ GIRK チャネルの機能異常とは考えられておらず、むしろ各疾患の原因は異なっていると考えるのが自然であろう。このように、様々な難治性疾患を含む多様な疾患に対して、GIRK チャネル活性化電流抑制作用をもつチペピジンのような薬物が、一つの用量で効果を示すということは、極めて興味深い。これらの事実から、以下の 2 つの命題が浮かび上がる。すなわち、1) GIRK チャネル抑制作用をもつ薬物はなぜ、このよ

うに多彩な薬理効果を示すのか. 2) GIRK チャンネルは脳機能においてどのような役割を演じているのか, ということである. これらの疾患に作用するという事は, GIRK チャンネルの制御によって広範なネットワークに働きかけることによって, 脳自身の制御系や恒常性に働きかけているのではないだろうか. しかしながら, これらの詳細なメカニズムの探求には至っておらず, そのメカニズムを解明することが, 原因の異なる多くの難治性疾患に奏功する画期的新薬の開発に繋がるかもしれない.

難治性脳疾患モデル	
脳梗塞後の排尿障害	Yamamoto et al.,2009
胎仔期 DES 曝露動物の学習障害	Soeda et al.,2014
薬物誘発誘発多動	Fujieda et al.,2006
治療抵抗性うつ病	Ogata et al.,2008, Kawaura et al.,2009
パーキンソン病	Kawakami et al.,2010
強迫性障害	Honda et al.,2010
統合失調症	Miki et al.,2012
炎症性疼痛	Urashima et al., 2014
薬物誘発搔痒	Iwashita et al., 2014
アルツハイマー病	Kawahara et al., 2016

Table 1 Pleiotropic effects of antitussives on various brain disease models in rodents.

さらに, もう一つ注目すべきことは, 上記の多彩な薬理効果が, 少なくともその薬理学的なメカニズムを検討した限り, 脳内ドパミン系が関与し, 特に, 腹側被蓋野-側坐核系のドパミン神経系が関わっている可能性である. 腹側被蓋野-側坐核のドパミン神経系は, 腹側被蓋野の GIRK チャンネルの抑制を介して活性化されることが示唆されている.

チペピジンの抗うつ様作用²⁹⁾を例にとってみると, 以下のような知見が得られている. (1) カテコールアミン合成阻害によって, 抗うつ様作用が消失する. (2) 皮下投与および側坐核内局所投与によって, ドパミン D₁ 受容体遮断薬によって抗うつ様作用が消失する. (3) チペピジンの腹側被蓋野内への局所投与によっても抗うつ様作用が発現する. しかしながら, これらのチペピジンの作用が真に GIRK チャンネルを介して発揮しているのか不明である.

そこで本研究においては、これらの背景を踏まえて、第一に、GIRK チャンネルの中でも特に中脳辺縁系において高発現が認められている GIRK2 を標的とし、GIRK チャンネルの生理学的意義、そして GIRK チャンネル阻害作用をもつ中枢性鎮咳薬の薬理学的作用点の解明を目的とし、バクテリオファージ P1 由来の配列特異的組換え酵素 Cre リコンビナーゼとその特異的組換え配列 loxP を用いた、Cre-loxP システムを採用し、部位特異的に GIRK2 を欠損するコンディショナルノックアウトマウスの作製を目的として実験を行った。第二に作製した loxP 配列挿入マウス (GIRK2^{floxed} マウス) を用いて、脳において広範に GIRK2 サブユニットを欠損させたマウス (GIRK2^{nesKO} マウス) とドパミンニューロン選択的に GIRK2 を欠損させたマウス (GIRK2^{DATKO} マウス) を作製し、うつ様行動をはじめとした表現型に及ぼす GIRK2 サブユニットを含む GIRK チャンネルの影響の検討を行った。本論文は、本研究で得た成績を記載し、考察および総括を加えてまとめたものである。

第2章 *Girk2* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス作製

第1節 本章の目的

これまで本分野においては、得られた様々な実験結果に基づき、多岐にわたる構造をもつ非麻薬性中枢性鎮咳薬の多彩な中枢機能改善作用は、主に **GIRK** チャネルの抑制を介してその作用を発揮していると想定し、研究を展開してきた。しかしながら、その直接の証拠はまだ十分とは言えない。

一方、これまで **GIRK** チャネルの生理学的意義を解明するため、既存の中枢作用薬を中心に、**GIRK** チャネル阻害活性をもつ化合物が探索されてきた³⁶⁻⁴²⁾が、今なお、最も強い阻害活性をもつ化合物は、ハチ毒で安定性の低いペプチドであるテルチアピンを除いてチペピジンなどの中枢性鎮咳薬である。他に、**SCH23390** があるが、この化合物は同程度のドパミン **D₁** 受容体拮抗作用を有し、選択的であるとは言えない⁴³⁾。このような現状もあり、ニューロンレベルでの **GIRK** チャネルはその活性化によりニューロンを抑制的に調節していることは知られているが、**GIRK** チャネルが生体(脳)の機能においてどのような役割を演じているのかよくわかっていない。1997年、**Signorini** らによって **GIRK2** の null マウスが作製され⁴⁴⁾、このマウスは野生型と比較し形態学的な変化は認められなかったものの、薬物誘発性のけいれんに対する感受性の亢進が確認された。さらに、最近になりこのマウスは、自発運動量の増加や不安関連行動の減弱が報告された⁴⁵⁾。これらの知見は、**GIRK** チャネルが脳において精神活動の一端に関わっていることを示唆している。一方、**GIRK** チャネルが脳の広い領域で、重要な役割を果たしていればいるほど、**GIRK2 null** マウスを用いてその役割を明らかにするのは非常に困難である。詳細に **GIRK** チャネルについて解析を行うには、より限局された部位において **GIRK** チャネルを欠損させ解析を行う必要がある。

以上のことから本章では、まず **GIRK** チャネルの生理学的意義、そして中枢性鎮咳薬の薬理学的作用点の解明を目指し、バクテリオファージ **P1** 由来の配列特異的組み換え酵素 **Cre** リコンビナーゼとその特異的組換え配列 **loxP** を用いた、**Cre-loxP** システム⁴⁶⁾を採用し、部位特異的に **GIRK2** タンパク質を欠損するコンディショナルノックアウトマウスの作製を目的として実験を行った。

第2節 実験成績

第1項 *Girk2* コンディショナルノックアウトマウス作製の流れ

*Girk2*のコンディショナルノックアウトマウス作製には、以下の2種類のマウスが必要となる。

① *Girk2/Kcnj6* floxed/floxedマウス

GIRK2をコードしている遺伝子である *Girk2/Kcnj6*の全体、もしくは最も重要な役割を果たしている exon の両端に loxP 配列を挿入したマウス

② Cre リコンビナーゼトランスジェニックマウス (Cre マウス)

目的とする遺伝子を、欠損させたい領域特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス

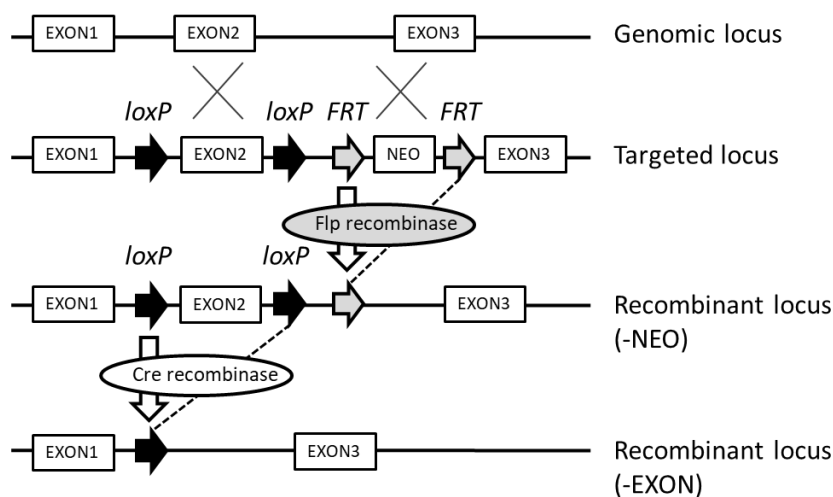
これら2種類のマウスの交配を重ねることにより、Cre リコンビナーゼが発現する領域特異的に *Girk2/Kcnj6* が欠損したマウスの作製が可能である。近年では、様々な Cre マウスが作製されている。DAT (dopamine transporter) プロモーター下流に Cre リコンビナーゼを発現する、ドパミンニューロン特異的 Cre マウスや、神経外胚葉の幹細胞のマーカールとして報告されている中間径フィラメント nestin のプロモーター下流に Cre リコンビナーゼを発現する、中枢特異的 Cre マウスなどは、The Jackson Laboratory や理化学研究所バイオリソースセンター (RIKEN BRC) より購入が可能である。そこで、本章では①の *Girk2/Kcnj6* floxed/floxed マウスの作製に取り組んだ。

第2項 本研究室におけるこれまでの試み

本研究は、予てより本研究室で取り組んできた課題であり、これまで行われてきた、①実験計画（標的 exon）、②ターゲティングベクターの構築、③相同組み換えスクリーニングを本項に記載する。

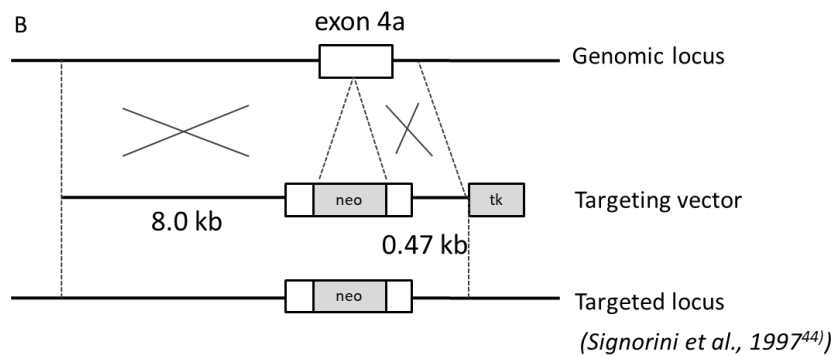
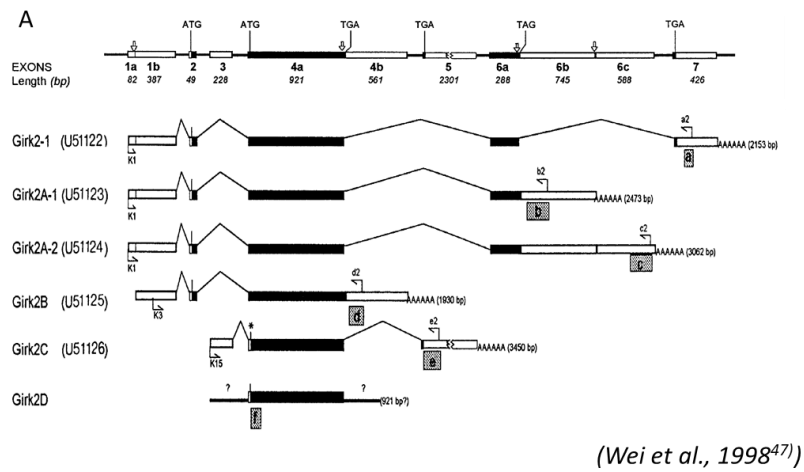
①標的 exon（Cre リコンビナーゼにより欠損させる exon）

コンディショナルノックアウトアレルは、通常、タンパク質をコードしている最も重要な exon の両側の非翻訳領域に loxP サイトを同方向になるように挿入し、Cre リコンビナーゼによる組換えで loxP により挟まれた exon を脱落させる、という手法で作製される（Supplemental Fig. 1）。前述した GIRK2 null マウスは、1997年に Shignorini らによって作製され、この時は、GIRK2 の2つ目の翻訳開始コドンが存在する exon4a を標的とし、これに neo 遺伝子を挿入するという手法であった⁴⁴⁾（Supplemental Fig. 2）。この exon4a は、GIRK2 タンパク質の全長のおよそ3分の2をコードしている⁴⁷⁾。Girk2 には、Girk2a（Girk2⁴⁸⁾ あるいは Girk2-1⁴⁴⁾）、Girk2b そして Girk2c（KATP-2⁴⁹⁾）、GIRK2A-1^{47,48)} あるいは BIR1⁴⁹⁾）という3つの転写産物アイソフォームの存在が知られているが、exon4a はそのすべてのアイソフォームに含まれていることが知られている⁴⁷⁾（Supplemental Fig. 2）。本研究におけるターゲティングベクターも、この exon4a を標的にしており、その両端に loxP 配列の挿入を行っている。



Supplemental Fig. 1 Design for generation of conditional allele used by Cre / loxP and Flp / FRT systems

Targeted exon are flanked by two tandem loxP signals and NEO cassette, and positive gene are flanked by two tandem FRT signals. Flp recombinase recognizes the FRT signals and Cre recombinase recognizes the loxP signals. These recombinase delete each cassette.



Supplemental Fig. 2 About *Girk2* gene (*Kcnj6*) and conventional *Girk2* knockout design

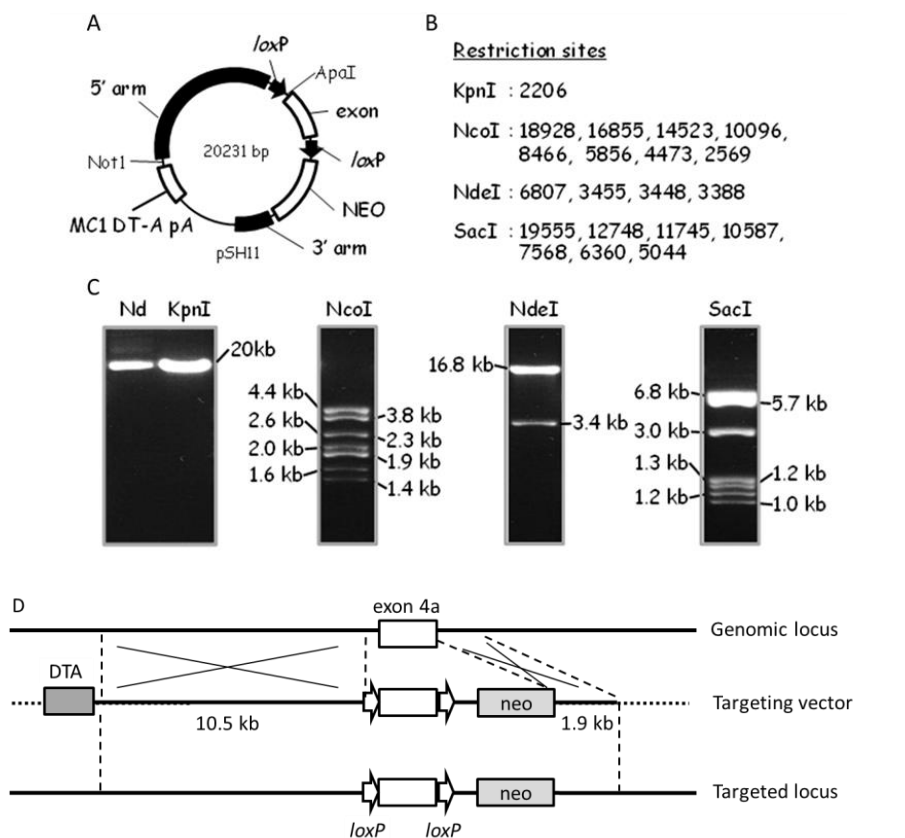
A. Exon organization and multiple transcripts of *Girk2*. Seven exons identified in this study are listed on top in their genomic order. GenBank accession numbers (U51122-U51126, to the right of the cDNA names) and cDNA lengths (listed in basepairs at the 3' ends) are indicated. The question marks in *Girk2D* (nonpolyadenylated mRNA) mean that the sequence flanking has not been identified.

*The start codon for *Girk2C*.

B. The genomic structure of the mouse *Girk2* gene locus and targeting vector used to disrupt the *Girk2* gene are shown..

②ターゲティングベクターの構築

ターゲティングベクターは、予てより本分野で作製されたものを用いた。本研究で用いるターゲティングベクターは、標的 exon に対し 5' 側に 10.5 kb, 3' 側に 1.9 kb の遺伝子領域を相同領域としたものである。(Supplemental Fig. 3)



Supplemental Fig. 3 Targeting vector pSH11 and design for *Girk2* gene targeting.

- A. Schematic map of pSH11.
 B. Restriction enzymes used for identification and its sites' sequence number are shown.
 C. Representative electrophoresis of digested DNA for identification are shown. Nd;nondigested DNA
 D. The targeting vector pSH11 contains 12.4kb of homologous *mGIRK2* genomic DNA, with 10.5kb located 5' and 1.9 kb located 3' to the PGK-neo cassette(neo). The neo cassette is flanked by two tandem *FRT* signals. In addition, both targeting vectors contain MC1-DT-A-poly(A)(DT-A) cassette.

本研究で用いるターゲティングベクターにおいては、現在最も汎用されている薬剤耐性遺伝子である *neo* 遺伝子をフォスフォグリセレートキナーゼ (PGK) プロモーターにつなぎ⁵⁰⁾、両端に *FRT* 配列を、さらに 5' 側の上流には *loxP* 配列を挿入したコンストラクト (p03) を共同研究者である荒木喜美教授より供与して戴き、これを用いた (Supplemental Fig. 3)。これにより、*neo* 遺伝子を Flp リコンビナーゼにより除去することが出来る。

さらにこのターゲティングベクターは、ランダムな組み込み現象に対する選択を行うため、pMC1-DT-ApA 遺伝子を荒木喜美教授より供与して戴き用いた (Supplemental Fig. 3). この DT-A 遺伝子は、ジフテリア毒素 A 鎖を発現すると、これが ADP リボシルトランスフェラーゼ活性を有しており、ペプチド鎖伸長因子 II を ADP リボシル化させ、失活させることによりタンパク質合成阻害を引き起こし、結果として細胞を死滅させ、ランダムなターゲティングベクターの挿入による細胞の生存を減らすことが期待できる。

③ 相同組換え現象のスクリーニング

②でも述べたように、陽性陰性選択後の後に生き残る ES 細胞コロニーの多くは、相同組換え型ではなく、ランダムな挿入によって生じたコロニーである。したがって、正しい標的遺伝子組換えを有する ES 細胞クローンを同定するために、サザンブロット分析または PCR 法解析を行って、薬剤耐性コロニーをスクリーニングする。

本研究では、サザンブロット分析と PCR 法解析の両方を採用した。全てのクローンで neo 遺伝子内の配列を含む PCR 法解析とターゲティングベクターのプラスミドベクター部分の配列を検出する PCR を行った (PCR vec.)。PCR vec. (-) クローンは、外部プローブを用いたサザンブロット分析により組換え体の検出を試みた。詳細は第 3 項に記載する。

これらのターゲティングベクターを用いて、本分野でこれまで得られた相同組換え現象のスクリーニングの結果を Table 2 にまとめた。

	Targeting vector	No. of colonies screened	No. of colonies PCR vec.- negative	PCR-3' positive	Southern blot
Exp 1	pSH8	192	46	0	0
Exp 2	pSH8	96	23	0	0
Exp 3	pSH8	96	26	0	0
Exp 4	pSH11	288	48	0	0
Exp 5	pSH11	240	46	0	1
Exp 6	pSH11	192	70	0	0
Exp 7	pSH11	96	—	—	0
Total	-	1200			1

Table. 2 Frequency of gene targeting events with homologous recombination.

第 3 項 本研究における遺伝子組換え ES 細胞の単離, スクリーニング

1) ES 細胞への遺伝子導入

遺伝子ターゲティングにおいて重要な事の 1 つは, 標的遺伝子組み換えの実験のために使用する ES 細胞株と同一のゲノム DNA を用いることである. つまり, ゲノム DNA クローンと ES 細胞は, マウスの同じ近交系に由来しなければならない. ターゲティングベクターの相同性部位と変異させる遺伝子座の配列が完全に一致している方が, 相同組換え効率が良いと言われている^{51,52)}.

本研究では, ターゲティングベクターを C57BL/6 由来で作製しているため, この系統により樹立された様々な ES 細胞を培養して, エレクトロポレーションによる遺伝子導入を行った. ターゲティングベクター pSH11 を用いて 9 回, エレクトロポレーション法による ES 細胞への遺伝子導入を行い, 1176 個の候補クローンを得た. これらの候補クローンのゲノム DNA を抽出し, 組換え体のスクリーニングに用いた.

2) 遺伝子組換え体の解析

① ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR 法)

前述したように, 全てのクローンで *neo* 遺伝子内の配列を含む PCR 法 (PCR-3') とターゲティングベクターのプラスミドベクター部分の配列を検出する PCR 法 (PCR vec.) を行った. PCR vec. (+) のクローンのゲノムでは, 相同組み換えが正しく起こっておらず, ベクターの配列が残存していることになり, 候補クローンから排除することができる (Negative PCR). この結果, PCR-3' (+) のクローンは 1176 個中 5 個, PCR vec. (-) のクローンは 1176 個中 416 個得た (Fig. 2).

PCR-3' (+) の 5 個のクローン (#96, #335, #588, #787, #978) は, 相同組換えを起こしている可能性が示唆された.

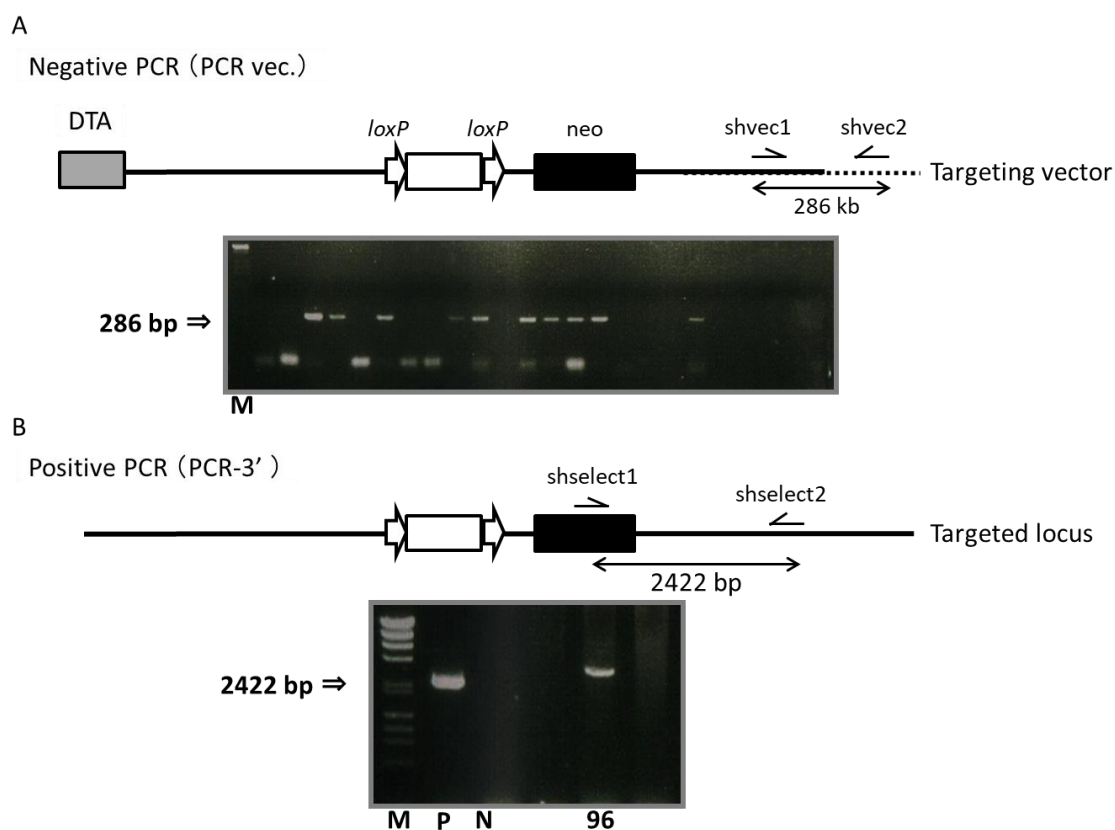


Fig. 2 PCR analysis of 3'arm

A. Schematic map of genomic for Negative PCR (PCR vec.). Location of primers and PCR products size are shown (Upper). Representative electrophoresis of PCR vec. products are shown (Bottom). Primers (shvec1, shvec2) used for PCR are shown.

B. Schematic map of genomic structure for Positive PCR (PCR-3'). Location of primers and PCR products size are shown (Upper). Representative electrophoresis of PCR-3' products are shown (Bottom). Primers (shselect1, shselect2) used for PCR are shown. M; molecular weight marker, P; positive control, N; negative control

② サザンブロット分析

組換え体の選別を行う際に、PCR法を用いると非常に簡便であるが、その一方で偽陽性、偽陰性が得られる場合も多いので、本研究では PCR-3' (+) のクローン、及び PCR vec. (-) であったすべてのクローンについて 3' 側外部プローブを用いたサザンブロット分析を行った。

通常、相同組換えが起こる場合は片側のアレルでのみ起こる場合がほとんどであるので、野生型のバンド (5.8 kb) と組換え型のバンド (4.5 kb) の 2 本が検出されるはずである。PCR-3' (+) のクローン、及びすべての PCR vec. (-) のクローンで、サザンブロット分析を行った結果、全てのクローンにおいて野生型のバンドのみの検出であった。これにより、ピックアップしたすべてのクローンに組換え体が含まれていなかったということが判明した (Fig. 3)。

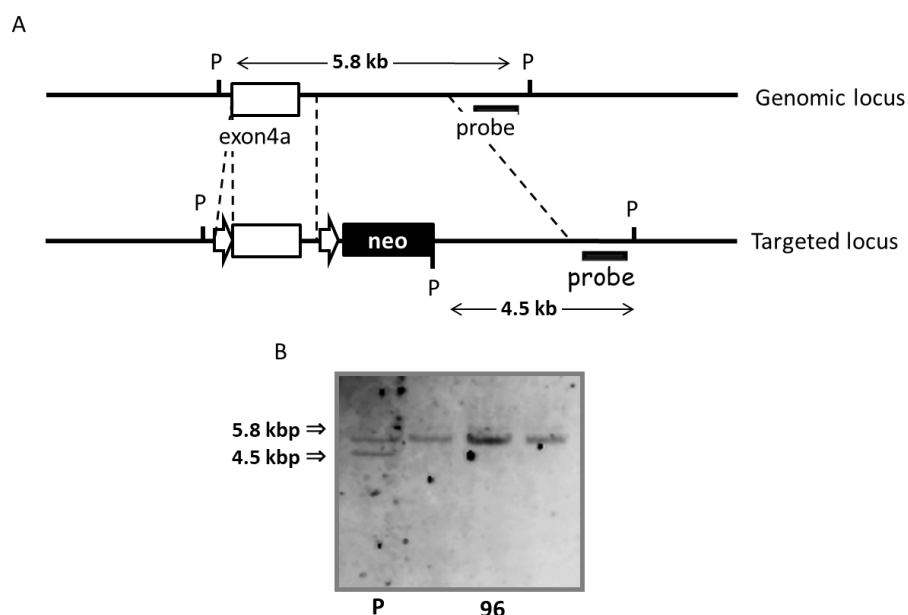


Fig. 3 Southern blotting analysis using probe 3'

A. Schematic map of genomic locus. Genomic structure and restriction map and location of probe used for southern blotting are shown. P;PstI

B. Representative southern blotting analysis of transfected ES cells by using PstI.

以上, これまで得られた結果を Table 3 にまとめた (Table 3).

	ES cell line	No. of colonies screened	No. of colonies PCR vec.- negative	PCR-3' positive	Southern blot
Exp 1	TT2	144	54	1	0
Exp 2	TT2	144	63	0	0
Exp 3	6NK3	24	11	0	0
Exp 4	ES03J-f	96	25	1	0
Exp 5	KAB6-6	96	39	0	0
Exp 6	BALTHA	96	36	1	0
Exp 7	BALTHA	192	48	1	0
Exp 8	BALTHA	192	79	1	0
Exp 9	6NK7	192	61	0	0
Total		1176		5	0

6NK3; C57BL/6 × C57BL/6 BALTHA; C57BL/6 × C57BL/6 KAB6-6;albino C57BL/6 × albino C57BL/6 ES03J-f; C57BL/6 × 129Sv

Table 3 Frequency of gene targeting events with homologous recombination.

第4項 CRISPR / Cas システムを用いた, ES 細胞の単離, スクリーニング

近年, 遺伝子改変動物作製のためのゲノム編集技術の開発が盛んにおこなわれている。ゲノム上の二本鎖切断 (double-strand break, DSB) の修復は主に, 非同末端連結 (Non-Homologous End Joining, NHEJ) もしくは, 相同組換えの2つの経路によって修復される⁵³⁾。また, ターゲティングベクター等を用いた相同組換えによるゲノム編集の標的配列付近にこのシステムを用いて nick を入れることで組換え効率が上昇することが知られている⁵⁴⁾。これらの DSB や nick を任意の配列に導入することを可能にしたのが, 人工ヌクレアーゼの Zinc Finger Nucleases (ZFNs)^{53,55)} や Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)⁵⁶⁻⁵⁸⁾, CRISPR / Cas システム^{54,59)} である。これらのうち本研究では, 比較的簡易に標的配列の設計が可能である CRISPR / Cas システムを用いることにより, 相同組換え効率の上昇を期待し検討を行った。CRISPR / Cas システムとは, 細菌や古細菌に見られる, 外部から侵入した核酸に対する一種の獲得免疫機構を応用したゲノム編集システムである。標的配列の mRNA 及び, DNA 切断酵素である Cas9 を1つのベクターにより発現することで, 任意の配列の切断を行うことができる。先にゲノム編集領域で開発された ZFN や TALEN のように DNA 配列ごとに異なる大きな蛋白を合成する必要はなく, 簡便かつ迅速にゲノム編集を行うことができるという特長がある。

CRISPR / Cas システムの標的認識は, PAM (protospacer adjacent motif) 配列 (NGG) の上流 20 塩基を目的の標的遺伝子配列 single guide RNA (sgRNA) として識別し認識を行う。Cas9 タンパク質は二つのエンドヌクレアーゼ活性により標的 2 本鎖 DNA のうち, sgRNA と相補的な DNA 鎖は HNH ドメインにより切断し, もう一方の DNA 鎖は RuvC ドメインにより切断する⁵⁹⁾。この片側のエンドヌクレアーゼ活性を失った Cas9 タンパク質は, nick を導入することが報告されている⁵⁹⁾。そこで本研究では, 共同研究者である荒木喜美教授の御考案の元, ターゲティングベクターによる相同組換え効率を高めるために, 5' arm と 3' arm 内にそれぞれ nick が導入されるよう Cas9 の RuvC ドメインの D10A 変異体 (px335, Add gene, USA) を用いて検討を行った。本研究で用いた, 実験計画を以下に記載する (Fig. 4)。

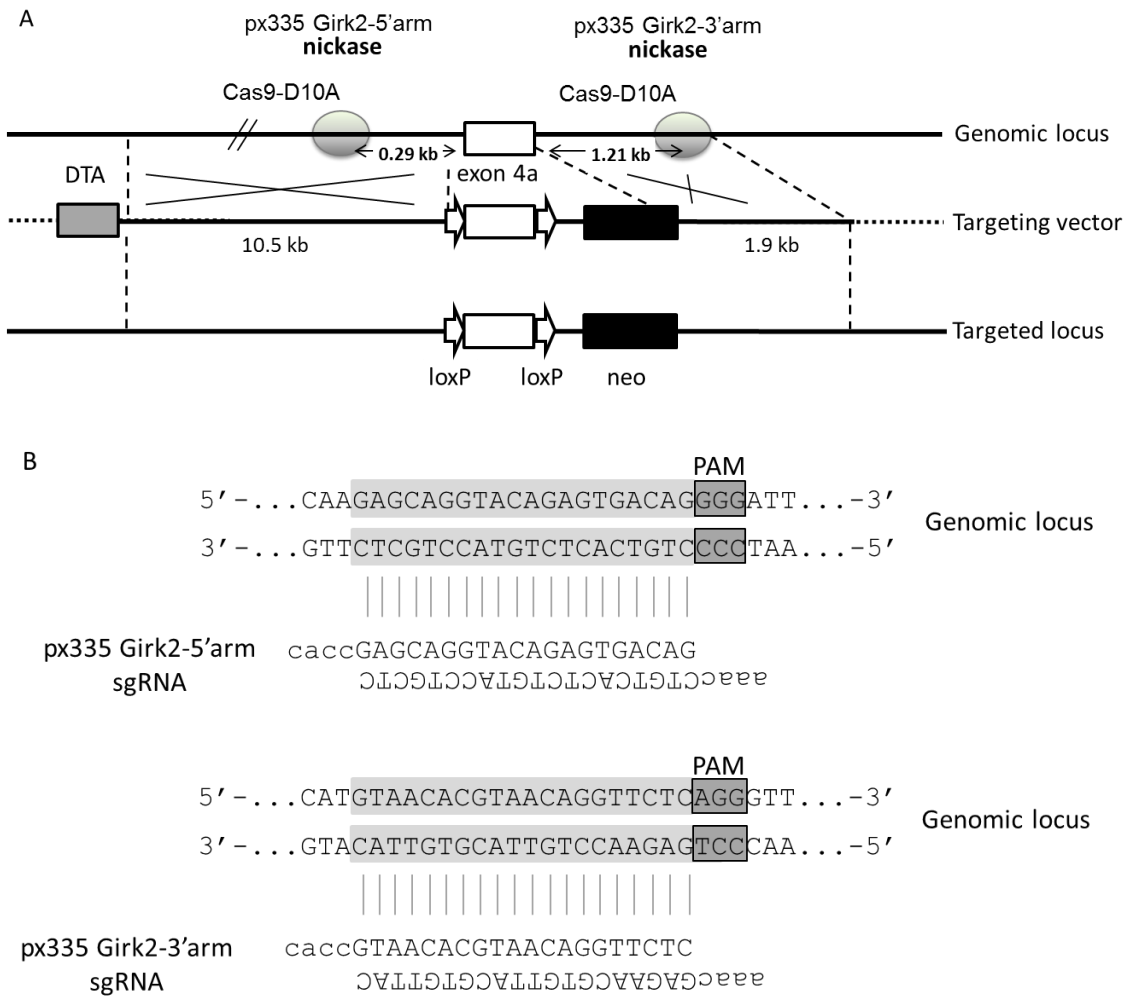


Fig. 4 Design for *Girk2* gene targeting with CRISPR / Cas system

A. Schematic map of genomic structure of mouse *Girk2* gene locus, targeting vector (pSH11), and px335.

B. Schematic showing the design of sgRNAs that target 5'arm and 3'arm.

1) ES 細胞への遺伝子導入

C57BL6/N 由来 ES 細胞 (6NK-7) を培養して, エレクトロポレーションによる遺伝子導入を行った. ターゲティングベクターと同時に, 前述した配列を認識する 2 種類の px335 ベクターを導入し, 72 個のクローンを単離した. これらの候補クローンのゲノム DNA を抽出し, 組換え体のスクリーニングに用いた.

2) 遺伝子組換え体の解析

① PCR 法

neo 遺伝子内の配列を含む PCR 法 (PCR-3') とターゲティングベクターのプラスミドベクター部分の配列を検出する PCR 法 (PCR vec.) を行った. この結果, PCR-3' (+) のクローンは 72 個中 15 個, PCR vec.(-)クローンは 72 個中 43 個であった.

PCR-3' (+) の 15 個のクローンは, PCR 法を用いた限りでは相同組換えを起こしている可能性が示唆された (Fig.5).

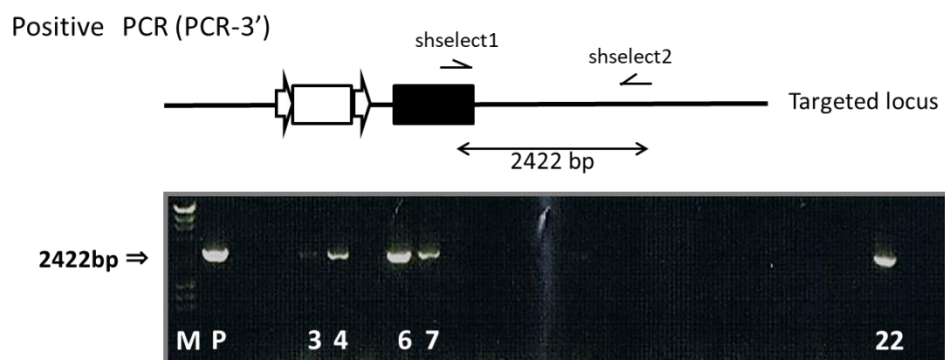


Fig. 5 3'arm PCR analysis with CRISPR / Cas system

Schematic map of genomic structure for Positive PCR (PCR-3'). Location of primers and PCR products size are shown (Upper). Representative electrophoresis of PCR-3' products are shown (Bottom). Primers (shselect1, shselect2) used for PCR are shown. M; molecular weight marker, P; positive control

② サザンブロット分析

本検討においても PCR vec. (-) であったすべてのクローンについて 3' 側外部プローブを用いたサザンブロット分析を行った。

PCR-3' (+) のクローン, 及びすべての PCR vec. (-) のクローンで, サザンブロット分析を行った結果, 14 個のクローンで野生型バンド, および組換え型バンドの 2 本のバンドが検出された. 次に酵素を変えて NsiI で断片化した後に, 同様に 3' 側外部プローブを用いてサザンブロットしたところ, 予想通りの 2 本のバンドが検出された (野生型 : 3.0 kb, 組換え型 : 5.2 kb; Fig. 6).

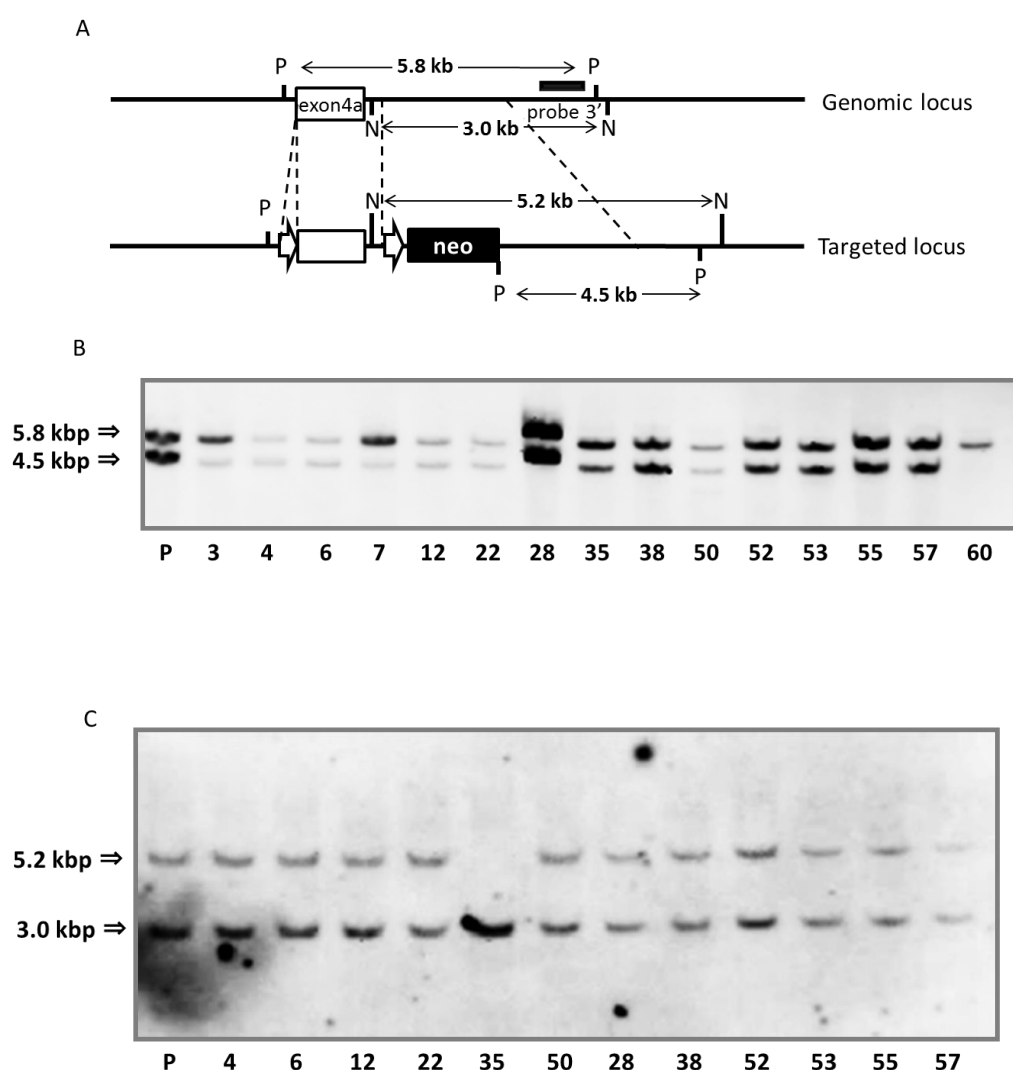


Fig. 6 Southern blotting analysis using probe 3' with CRISPR / Cas system

A. Schematic map of genomic locus. Genomic structure and restriction map and location of probe used for southern blotting are shown. P;PstI, N;NsiI

B. Representative southern blotting analysis of transfected ES cells by using PstI.

C. Representative southern blotting analysis of transfected ES cells by using NsiI.

以上 2 種類のサザンブロット分析によって、3' 側相同 DNA を含む領域の組換えが正しく起こっていることが明らかとなったので、次に 5' 側の組換えを確認する為、PCR 法及び、サザンブロット分析を行った。

PCR は、5' アームの loxP 配列の有無を認識する検討を行った。この結果、8 個のクローンで 5' アームの loxP の保持が確認された (Fig. 7)。

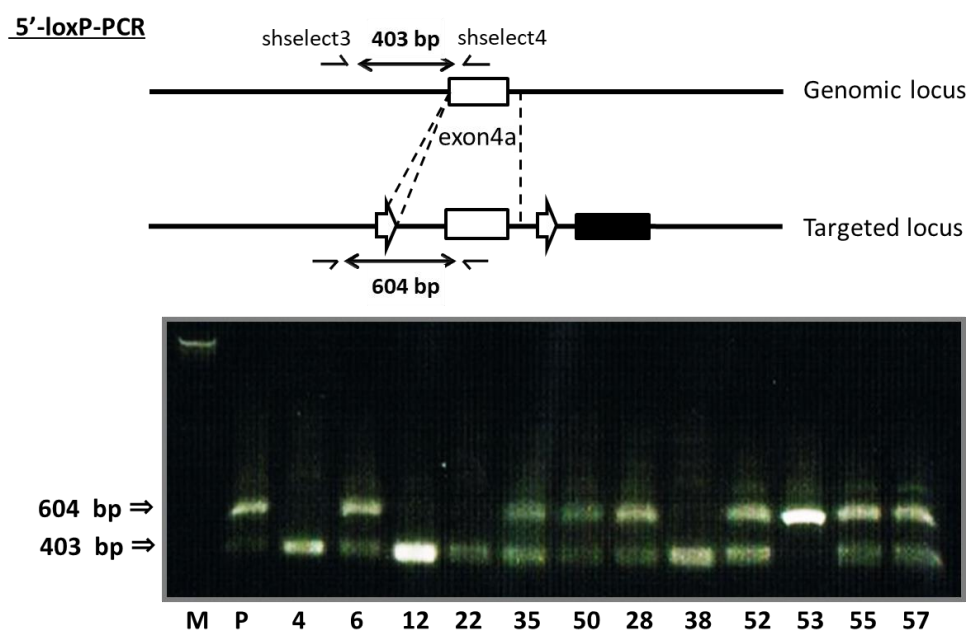


Fig. 7 5'arm PCR analysis with CRISPR / Cas system

Schematic map of genomic structure for Positive PCR (5'-loxP-PCR.). Location of primers and PCR products size are shown (Upper). Representative electrophoresis of 5'-loxP-PCR. products are shown (Bottom). Primers (shselect3, shselect4) used for PCR are shown. M; molecular weight marker, P; positive control

サザンブロット分析は, *KpnI* と *XhoI* によって断片化しゲノム DNA に対し, 5' 側相同 DNA の外部に設計したプローブを用いてサザンブロットを行ったところ, SB-3' (+) の 14 クローンのうち 7 個のクローンで予想サイズの 2 本のバンドが得られた (野生型 : 20.1 kb, 組換え型 : 13.8 kb ; Fig. 8).

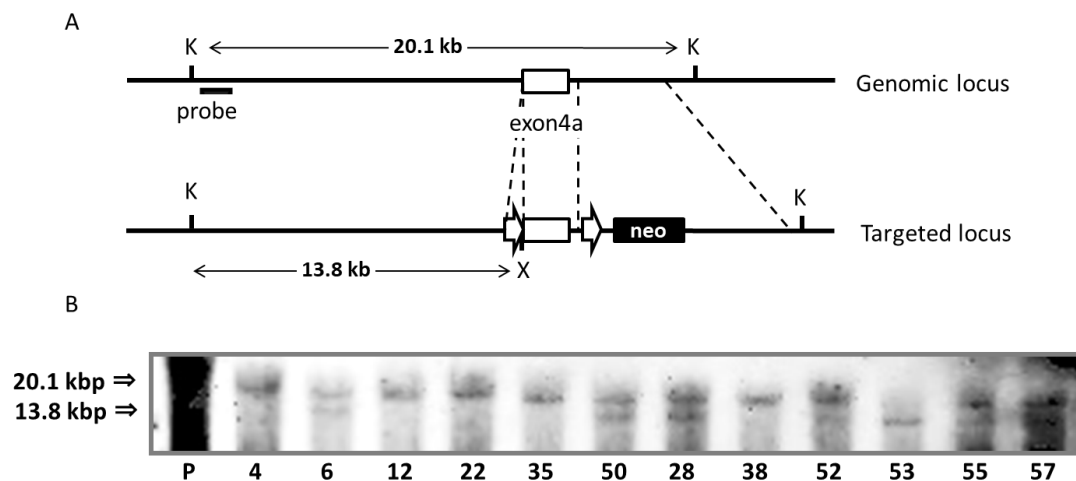


Fig. 8 Southern blotting analysis using probe 5' with CRISPR / Cas system

A. Schematic map of genomic locus. Genomic structure and restriction map and location of probe used for southern blotting are shown. K;*KpnI*, X;*XhoI*
 B. Representative southern blotting analysis of transfected ES cells by using *KpnI* and *XhoI*.

これまで、CRISPR / Cas システムを用いて本研究で得られた結果の詳細を以下に示す (Table 4).

	PCR-3' positive	3'-Southern blot	5'-loxP-PCR positive	5'-Southern blot
3	○	○*	-	-
4	○	○	×	×
6	○	○	○	○
7	○	○*	-	-
12	○	○	×	×
22	○	○	×	×
28	○	○	○	○
35	○	○*	○	×
38	○	○	×	×
50	○	○	○	○
52	○	○	○	○
53	○	○	○**	○**
55	○	○	○	○
57	○	○	○	○
60	○	×	-	-
Total	15	14	8	7

Table 4 The individual result of gene targeting events with homologous recombination.

*, Band of wild allele is darker than floxed allele. **, Point of loxP of 5'arm is partly homo.

以上、PCR とサザンブロットの結果から、#6, #28, #50, #52, #53, #55, #57 クローンは目的の組換え ES 細胞クローンであることが確認された。以降、これらの ES 細胞を用いてキメラマウスの作製に取り組んだ。

	EScell line	No. of colonies screened	No. of colonies PCR vec.- negative	PCR-3' positive	3'-Southern blot	5'-loxP-PCR positive	5'-Southern blot
Exp 1	6NK-7	72	43	15	14	8	7
Total		72			14		7

Table 5 Frequency of gene targeting events with homologous recombination by coinjection of Cas9 expressing vector.

第5項 キメラマウスおよび *Girk2/Kcnj6*^{floxed/floxed} マウスの作製

前項で記載した相同組換えが認められたクローンのうち、#6, #28, #52, #53, #55, #57の6つのラインでキメラマウスの作製を熊本大学 生命資源研究・支援センター 疾患モデル分野に委託した。これらのキメラマウスと野生型マウスを交配させ F1 マウスの作製を試みた。ジェノタイプの確認には、耳からゲノム DNA を抽出し、第3項で用いた neo 遺伝子内の配列を含む PCR 法 (PCR-3') により確認を行った (Fig. 9)。

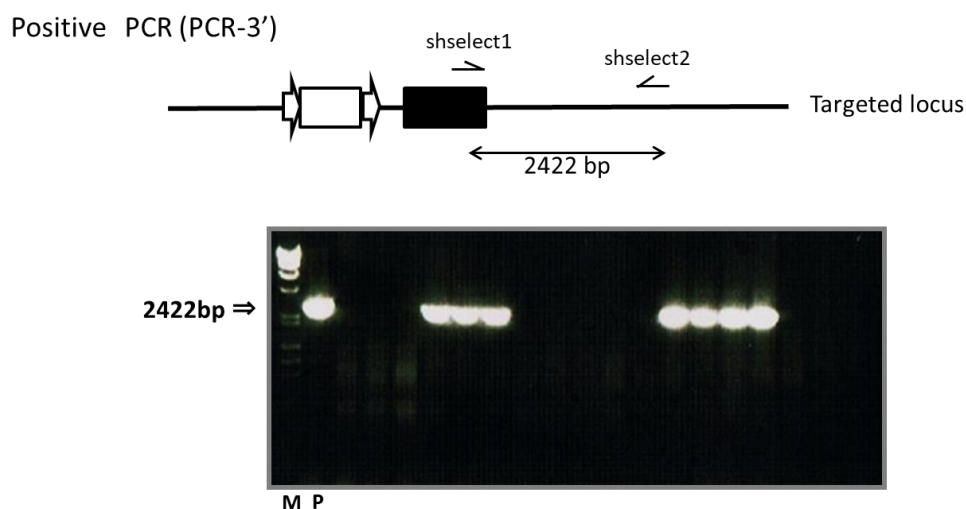


Fig. 9 3'arm PCR analysis with DNA extracted from F1 mouse

Schematic map of genomic structure for Positive PCR (PCR-3'). Location of primers and PCR products size are shown (Upper). Representative electrophoresis of PCR-3' products are shown (Bottom). Primers (shselect1, shselect2) used for PCR are shown. M; molecular weight marker, P; positive control

6つのラインのうち、#6, #28, #52, #53, #55の5つのラインにおいて F1 マウスが得られた。これら F1 マウス同士の交配により、*Girk2/Kcnj6*^{floxed/floxed} マウスの作製を試みた。ジェノタイプの確認には、第4項で用いた 5' アームの loxP 配列の有無を認識する PCR を行った (Fig. 7)。以下すべての floxed アレルのジェノタイプングには本 PCR 法を採用した。

Flp/*FRT*システムを用いた *neo* 遺伝子の抜き取り

挿入した *neo* が従来の遺伝子発現に影響を及ぼす可能性を除去するため、*neo* の両端に挿入した *FRT* 配列を認識する、配列特異的遺伝子組み換え酵素 Flp リコンビナーゼによる *neo* の除去を行った。キメラマウス作製の際、キメラ率の高かった #28, #52 のラインを用いて、*neo* 遺伝子の抜き取りを ES 細胞レベルで行った。抜き取りは、CAG プロモーターの下流に Flp リコンビナーゼ、IRES 配列、ピューロマイシンを発現するベクターを環状のまま ES 細胞に導入、一過性に Flp リコンビナーゼを発現させることで行った。抜き取りの確認には、PCR 法を用いた (Fig.10)。

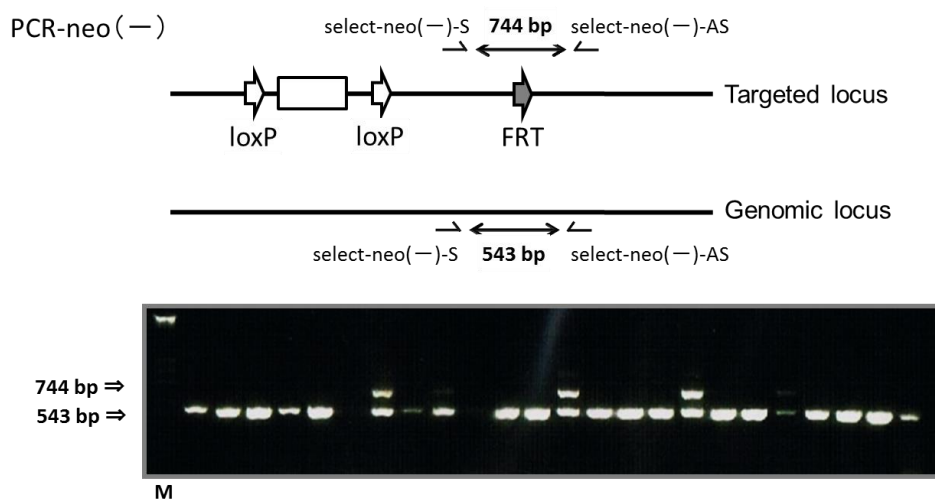


Fig.10. PCR analysis of elimination *neo* by flp recombinase

Schematic map of genomic structure for PCR-*neo*(-). Location of primers and PCR products size are shown (Upper). Representative electrophoresis of PCR-*neo*(-) products are shown (Bottom). Primers (select-*neo*(-)-S, select-*neo*(-)-AS) used for PCR are shown. M; molecular weight marker

抜き取りの確認が行えたクローンのうち、#28Flp49, #28Flp78, #28Flp89, #52Flp6, #52Flp19 の 5 つのラインにおいて、キメラマウスの作製を熊本大学 生命資源研究・支援センター 疾患モデル分野に委託した。なお、第 3 章以降の実験には、*neo* 遺伝子の抜き取りを行った ES 細胞より樹立されたマウスより実験を行った。

第3節 考察

本研究において、*Girk2* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの作製を目標に研究を行い、従来の方法ではターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、1176 個のクローンについて PCR 法、およびサザンブロット分析を行ったが目的の組換え体の作製に至らなかった。しかし、CRISPR/Cas システムを用いた検討では、解析した 72 個のクローンの中で、7 個で目的の組換え体を得ることができた。その中の 2 個のクローンで、*neo* 遺伝子を除去した 5 つのサブクローンの作製に成功した。本研究を成功に導く上で、大きな転換点となった①CRISPR/Cas システムを用いた相同組み換え効率の飛躍的な上昇、②本研究における CRISPR/Cas システムの応用の特徴について以下、考察する。

①CRISPR/Cas システムを用いた相同組み換え効率の飛躍的な上昇

本研究で標的とした遺伝子に対する相同組換えの効率は、従来法を用いた場合、本研究 (1176 クローン) および、これまでの本分野の研究 (1200 クローン) で得られた合計 2376 クローンのうち 1 クローンと 0.04 %に過ぎなかった。前述したように、相同組換えの効率は対象となる遺伝子の染色体上での **configuration** に大きく影響され、高効率の場合は 10 分の 1 ほど、低効率の場合は数千分の 1 と大きく変動することが知られており、本研究の対象遺伝子は、後者の相同組み換え効率が低い遺伝子であると考えられる。一方で、この遺伝子に対するターゲティングベクターの両アームをそれぞれ認識し、**nick** を導入する D10ACas9 変異体発現ベクター 2 種類を同時導入する事により、相同組換えの効率は 72 分の 7 (9.72%) となった。使用した ES 細胞、遺伝子導入条件等に違いがあるため一律に評価はできないが、これらの結果は CRISPR/Cas システムを用いることにより、200 倍以上の飛躍的な相同組み換え効率の上昇が起きることを示している。この結果が他の遺伝子を標的としたターゲティングベクターに対しても同様の結果が得られるかは、検討の余地があるが、本システムはこれまで相同組み換え効率が低く、実験上諦めざるをえなかった多くのターゲティングベクターについて再考する機会を与えることになり、基礎研究上、重要な知見であると考えられる。

②本研究における CRISPR/Cas システムの応用の特徴

CRISPR/Cas システムの遺伝子改変マウス作製への応用は、2013 年 Wang H ら⁶⁰⁾、Yang H ら⁶¹⁾の報告に端を発し急速に研究が進んできた。これらの報告は Cas9 発現ベクターを ES 細胞に導入する方法や、受精卵に直接マイクロインジェクションする方法である。この手法では前述したとおり、NHEJ を誘導する DSB を引き起こす Cas9 を発現することから、**off target** 効果による非特異的な修復が起きる可能性が高く、ゲノム中から sgRNA と相補的な配列に類似した配列を探し出し、検討する必要がある。一方で、本研究では **nickase** を用いているため、理論上 NHEJ による修復は起きず、かなりの確率で **off target** は抑制

されると考えられる.

第3章 GIRK2^{nes}KO マウスの作製および表現型解析

第1節 本章の目的

本研究室では、これまでに GIRK チャネル抑制作用をもつ中枢性鎮咳薬である、チペピジン、クロペラスチン、カラミフェン、およびデキストロメトルファン²⁹⁾の調べた全ての薬物が動物モデルで抗うつ様作用を示すことを報告してきた²⁹⁾。さらに、近年 GIRK2 コンベシショナルノックアウト (GIRK2^{fl}) マウスにおいて、うつ様行動の評価に用いられる、尾懸垂試験での無動時間の短縮作用と新奇環境摂食抑制試験における摂食潜時の短縮が報告されており⁶²⁾、中枢における GIRK チャネルがうつ様行動に関連することが示唆されている。

本章では、第2章までに作製された GIRK2^{fl} マウスと、Nestin-Cre トランスジェニックマウス (理化学研究所バイオリソースセンターより入手) を交配させ、脳特異的 GIRK2 欠損 (GIRK2^{nes}KO) マウスを作製し、その表現型を解析した。なお、Nestin-Cre トランスジェニックマウスは、Nestin のプロモーター下流で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスである。Nestin は、IV 型中間径フィラメントに分類される細胞骨格蛋白で、胎生期中枢神経の形成過程での幹細胞に選択的に発現する蛋白質である。

第2節 実験成績

第1項 GIRK2^{nes}KO マウス作製

第2章までに作製された GIRK2^{floxed} マウス (#52Flp19) と Nestin-Cre マウスを交配させることにより, GIRK2^{nes}KO マウス (*Girk2*^{floxed/floxed}; *nestin*^{cre/+}) を作製した. 作製されたマウスの体重は, 12週齢で, GIRK2^{floxed} マウス (24.4 ± 0.7 g), Nestin^{cre} マウス (24.4 ± 0.7 g), GIRK2^{nes}KO マウス (25.4 ± 0.9 g) であり, 有意な差はなかった (Fig. 11).

この GIRK2^{nes}KO マウスの脳より mRNA を抽出し, GIRK2 の mRNA 量を RT-PCR 法にて定量した. GIRK2^{nes}KO マウスは, コントロール群と比較し顕著な mRNA レベルの減少 (7.6 ± 0.09 %) を示した (Fig. 12).

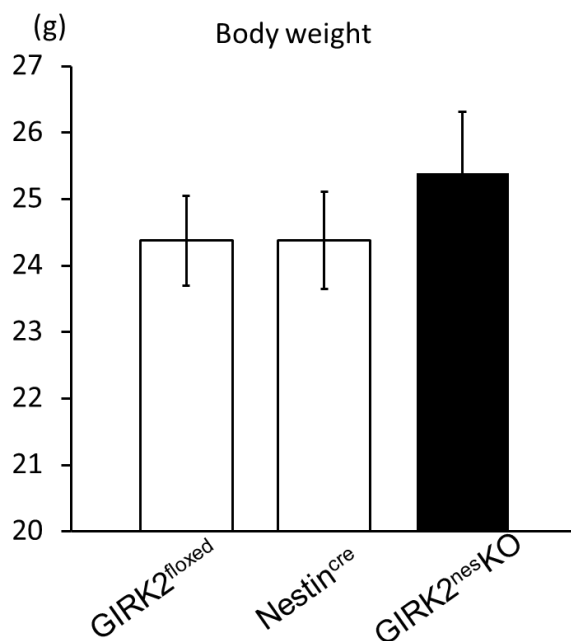


Fig. 11 Body weight of GIRK2^{nes}KO and control mice at 12-week-old

GIRK2^{floxed} (n=9), Nestin^{cre} (n=8), and GIRK2^{nes}KO mice (n=7). All mice determined are male. Values are shown as the mean ± S.E.M.

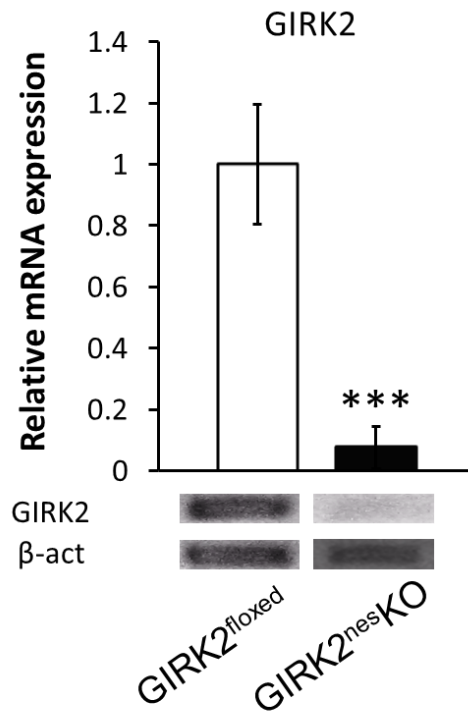


Fig. 12 Expression of GIRK2 mRNA in the brain.

In GIRK2^{nesKO} mice, *Girk2* mRNA in brain was remarkably decreased. The vertical bar of each column indicates the standard error of the mean.

*** p<0.001 (Student's t-test)

第2項 GIRK2^{nes}KO マウスの免疫組織化学的解析

本項では GIRK2^{nes}KO マウスにおいて、GIRK2 の発現が高く、特徴的な免疫染色像が得られる腹側被蓋野、黒質領域および青斑核領域において、GIRK2 の蛍光免疫染色を行った。これらの領域で特徴的に発現する、ドパミンやノルアドレナリンを含むカテコールアミン神経のマーカーとして広く使用される、tyrosine hydroxylase (TH) との蛍光免疫二重染色法を用いて検討した。その結果、GIRK2^{nes}KO マウスの腹側被蓋野、黒質および青斑核領域において、GIRK2 が欠損していることを確認した (Fig. 13 and 14)。

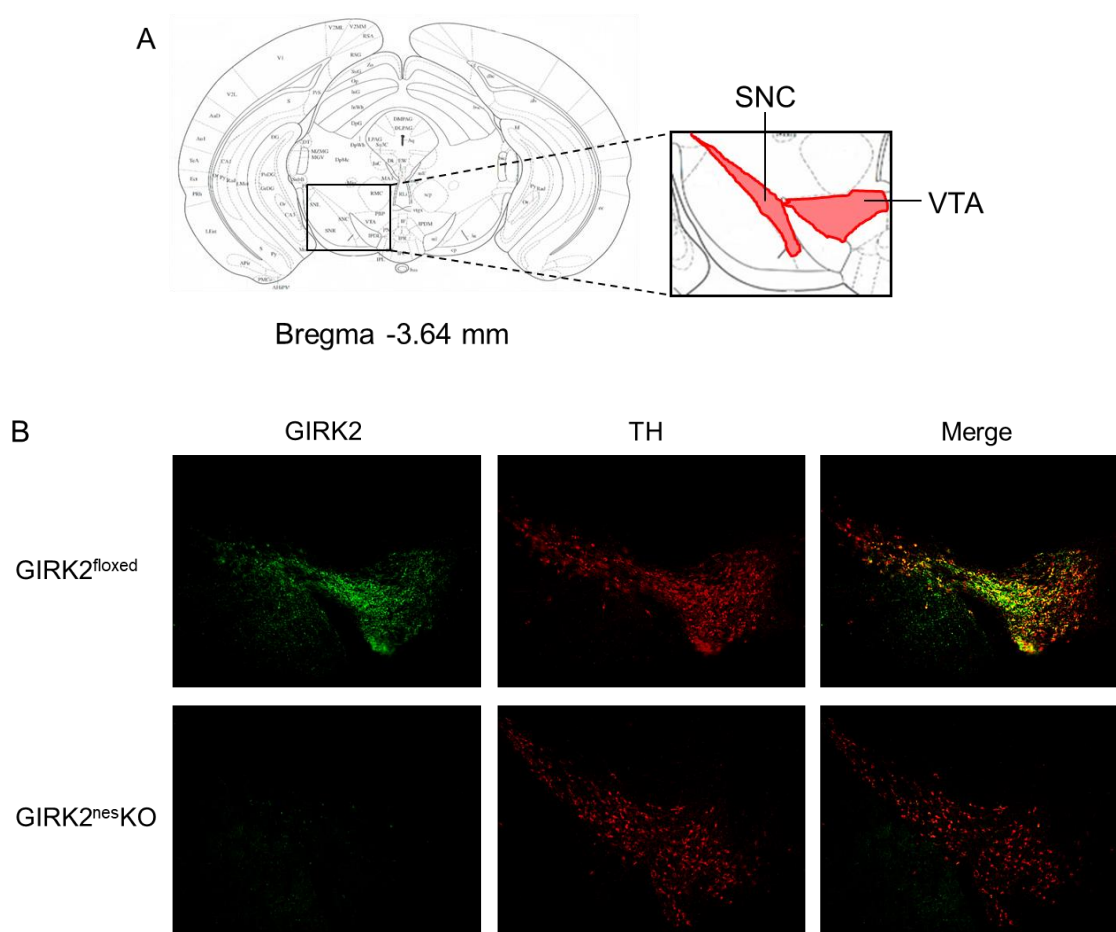


Fig. 13 Expression of GIRK2 protein in the ventral tegmental area and substantia nigra.

A. A representative schematic diagram of the region of the brain.

B. Microscopy showing immunohistochemistry for GIRK2 (green) and TH (red) in midbrain in sections from GIRK2^{floxed} mice and GIRK2^{nes}KO mice.

SNC, substantia nigra pars compacta

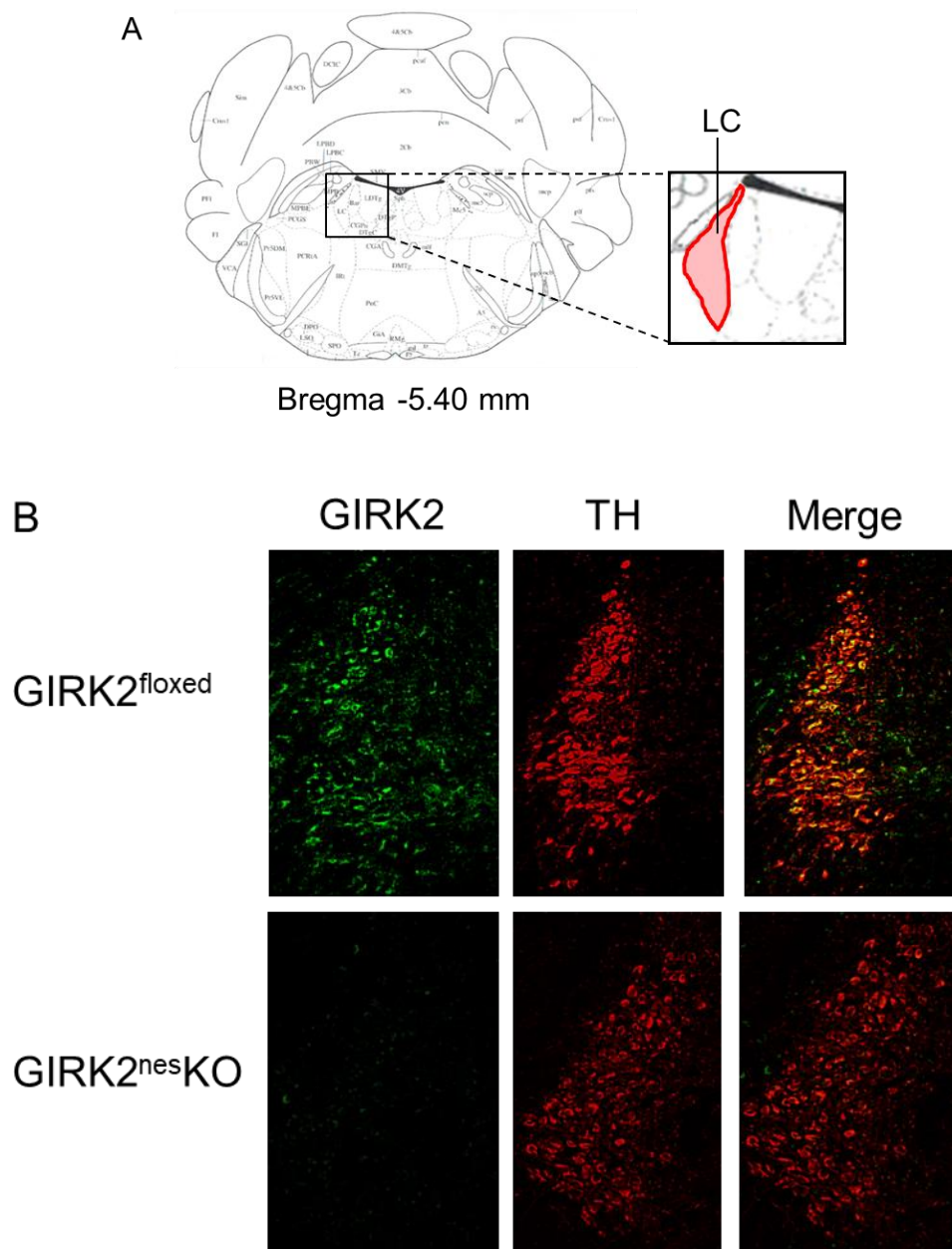


Fig. 14 Expression of GIRK2 protein in the locus coeruleus.

A. A representative schematic diagram of the region of the brain.
 B. Microscopy showing immunohistochemistry for GIRK2 (green) and TH (red) in sections from GIRK2^{flxed} mice and GIRK2^{DAT}KO mice.

第3項 GIRK2^{nesKO} マウスの行動薬理的解析

本項では、まず、GIRK2^{nesKO} マウスのうつ様行動について強制水泳試験法で調べた。次いで、このマウスの自発運動量をオープンフィールド試験法で測定した。その結果、興味深いことに強制水泳試験において、GIRK2^{nesKO} マウスは、コントロール群に比べて無動時間を有意に短縮させた (GIRK2^{floxed} マウス; 121.9 ± 21.0 秒, Nestin^{cre} マウス: 111.4 ± 16.4 秒, GIRK2^{nesKO} マウス: 31.9 ± 12.3 秒, GIRK2^{floxed} マウスより 73.8 %減少, Nestin^{cre} マウスより 71.4 %減少)。一方、GIRK2^{nesKO} マウスと二つのコントロール群 (GIRK2^{floxed} マウス, Nestin^{cre} マウス) の間で、自発運動量に有意な差は認められなかった (Fig. 15)。

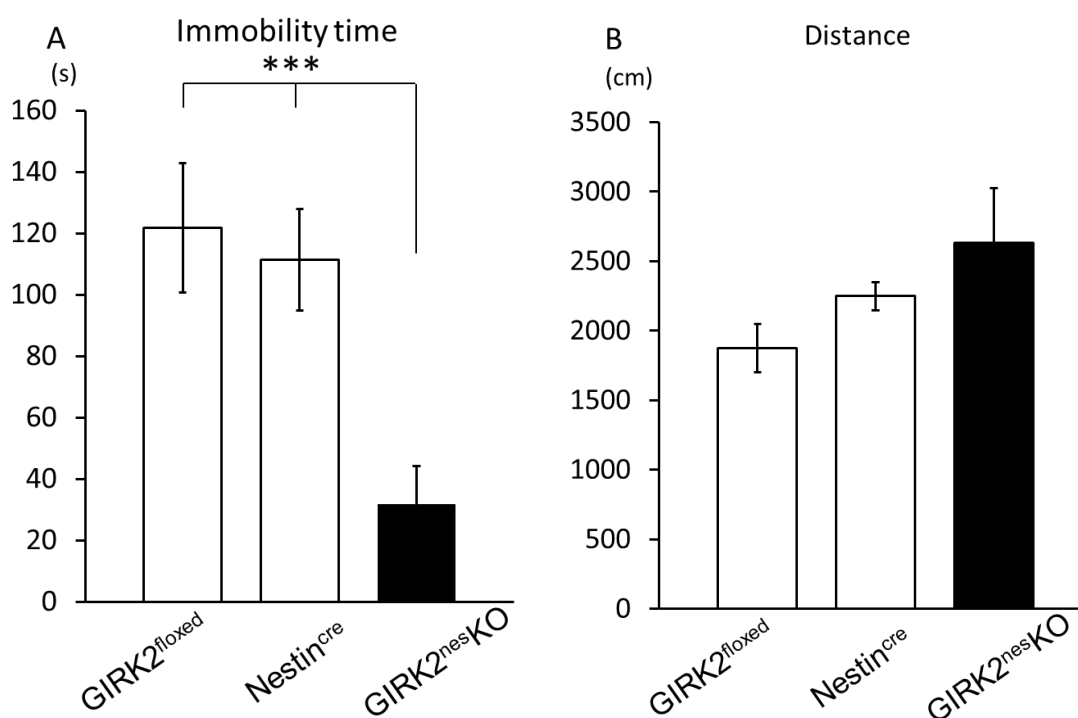


Fig. 15 Effects of deletion of GIRK2 in the forced swimming test and the open field test

A. Effect of deletion of GIRK2 on the immobility time in the forced swimming test in 12-week-old mice. (n=7-9) The vertical bar of each column shows the standard error of the mean.

Data are analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test. ***p<0.001

B. Effect of deletion of GIRK2 on the locomotor activity in the open field test in 13-week-old mice. (n=7-9) The vertical bar of each column shows the standard error of the mean.

Data are analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

第3節 考察

本章では *GIRK2*^{nesKO} マウスを作製し、このマウスの表現型について解析した。その結果、*GIRK2*^{nesKO} マウスは体型・毛並などの外見、体重などにおいて、コントロール群のマウスとの間で違いは見られなかった。しかしながら、*GIRK2*^{nesKO} マウスの雄は不妊であり、雌では育児放棄が多く見られた。雄の不妊の現象は、*GIRK2*^{+/+}マウスで報告されている⁴⁴⁾。*GIRK2* が妊娠や育児に関わっているのかを含めて、今後の検討課題である。

本研究で使用している *Nestin-Cre* マウスは、前述したとおり理研バイオリソースセンターより入手したもので、これまでいくつかの研究において使用された実績がある⁶³⁾。*RT-PCR* 法を用いて検討を行ったところ、わずかではあるが *GIRK2*^{nesKO} マウスの脳において *Girk2* mRNA が観察されたが、免疫染色を用いて解析を行ったところ、観察した領域においては、*GIRK2* はほとんど観察されなかった。*Girk2* mRNA がわずかに観察された理由は、1) *Cre* リコンビナーゼの発現が弱い領域で完全な欠損が起きていない可能性、2) 脳内において発生過程が諸説あり、神経外胚葉由来幹細胞のマーカーとして知られる *Nestin* を発現する前駆細胞に由来するのではなく、卵黄囊の骨髄性前駆細胞に由来する可能性が示唆されているミクログリア等に *GIRK2* が発現している可能性の2点が考えられる。しかしながら、詳細な解析に至っていない為、今後解析が必要である。ちなみにミクログリアにおける *GIRK* チャネルの発現の有無を議論した報告はこれまでにない。

興味深いことに、抗うつ薬の評価系として信頼性が高く、頻用されている強制水泳試験において *GIRK2*^{nesKO} マウスはコントロール群と比較し、顕著に無動時間を短縮させた。すなわち、脳全体における *GIRK2* の欠損により、うつ様行動が減弱することが示された。前述したとおり、近年 *GIRK2*^{+/+}マウスにおいて、うつ様行動評価系である、尾懸垂試験での無動時間の短縮作用と新奇環境摂食抑制試験における摂食潜時の短縮が報告されており⁶²⁾、中枢における *GIRK2* サブユニットを含む *GIRK* チャネルがうつ様行動に関連することが示唆されている。これらの報告では、さらに既存の抗うつ薬である *SSRI* のシタロプラムの尾懸垂試験における無動時間短縮作用が *GIRK2*^{+/+}マウスでは減少することを報告しており、セロトニン神経と *GIRK2* との関連を報告している。さらに他の報告では、*GIRK2*^{+/+}マウスの青斑核ニューロンにおいて *burst firing* を伴う神経細胞数が増加しており、その投射先である海馬や扁桃体においてノルアドレナリン量が増加していることを報告している⁶⁴⁾。さらに近年、「次世代の抗うつ薬候補」として注目を集めている化合物として、ケタミンをはじめとする *NMDA* 型グルタミン酸受容体遮断薬がある。このうち、抗うつ様作用をもつ *AP5* と *Ro-25-6981* のマウスへの投与において、海馬における *GIRK2* の発現低下、および *GABA_B* 受容体と *GIRK2* の共局在の減少が引き起こされるという報告がなされた⁶⁵⁾。このようにうつ様行動と *GIRK* チャネルの関連は近年少しずつ報告されてきているが、本研究もこれらの研究と一致し、脳での *GIRK2* の欠損はうつ様行動を減少させることを示唆した。

また、本分野ではこれまでに、GIRK チャンネル抑制作用をもつチペピジンの作用プロファイルの解析の一環として、神経興奮のマーカーとして広く使用される c-Fos タンパク質の発現を指標に解析を行ってきた³⁵⁾。その結果、チペピジンは、既存の抗うつ薬が共通して c-Fos タンパク質発現を増加させる扁桃体中心核においてその発現を増加させ、加えて、分界条床核、縫線核、青斑核、腹側被蓋野、側坐核といった様々な脳領域において c-Fos タンパク質の発現を増加させた。これらの作用が、チペピジンが GIRK チャンネルを直接抑制することによる一次作用か、あるいは GIRK 抑制によって賦活化される神経伝達物質による二次作用によるものかについては検討の余地があるが、少なくとも GIRK チャンネル抑制により脳内の様々な領域で広範な影響を及ぼす可能性が示唆されている。これらの知見と GIRK2^{nes}KO マウスのうつ様行動の減少を併せて考えると、チペピジンの抗うつ様作用の発現に GIRK チャンネル抑制作用が関与する可能性が示唆された。

第4章 GIRK2^{DATKO} マウスの作製

第1節 本章の目的

本研究室では、これまでにチペピジンははじめとする中枢性鎮咳薬が動物モデルにおいて強い抗うつ様作用をはじめとして様々な難治性の脳疾患動物モデルに対して顕著な改善作用をもつことを報告してきた。さらに、これらの鎮咳薬は、1) 腹側被蓋野から急性単離したドパミンニューロンにおいて GIRK チャネル活性化電流を抑制すること^{10,66}、2) チペピジンの投与により、TH 陽性細胞と腹側被蓋野における神経興奮のマーカーである c-fos 陽性細胞の共局在細胞数が増加すること^{10,66}、3) その投射先である側坐核においてドパミン遊離量が増加すること、などを報告してきた²²。これらの知見と薬理的知見を踏まえて、チペピジンの抗うつ様作用は、腹側被蓋野-側坐核系のドパミンニューロンの活性化によることを示唆してきた²⁹。

本章では、第2章までに作製された GIRK2^{flox} マウスと The Jackson Laboratory より入手した DAT (dopamine transporter) プロモーターの制御により Cre リコンビナーゼを発現するマウス⁶⁷ (DAT-Cre マウス) を交配させることにより作製した、ドパミン神経特異的 GIRK2 欠損マウス (*Girk2^{flox/flox}*, DAT^{cre/+}; GIRK2^{DATKO}) の作製に取り組み、その表現型を解析した。

第 2 節 実験成績

第 1 項 GIRK2^{DATKO} マウス作製

第 2 章までに作製された GIRK2^{floxed} マウス (#52Flp19) と DAT-Cre マウスを交配させることにより, GIRK2^{DATKO} マウス (*Girk2* ^{floxed/floxed ; DAT ^{cre/+}) を作製した. 作製した GIRK2^{DATKO} マウスは, コントロール群 (GIRK2^{floxed} マウス, DAT^{cre} マウス) に比べて, 体型や毛並など外見上, 違いは見られなかった. 出生した雌雄の割合もほぼ 1:1 でコントロール群と変わりはなかった. また, 8 週齢および 12 週齢の時点で雌雄ともに体重にも有意な差は認められなかった (8 週齢雄: GIRK2^{floxed} マウス: 21.1 ± 0.5 g, GIRK2^{DATKO} マウス: 19.6 ± 1.5 g, 8 週齢雌: GIRK2^{floxed} マウス: 17.8 ± 0.5 g, GIRK2^{DATKO} マウス: 18.4 ± 0.9 g, 12 週齢雄: GIRK2^{floxed} マウス: 23.5 ± 0.4 g, DAT^{cre} マウス: 24.1 ± 0.3 g, GIRK2^{DATKO} マウス: 23.1 ± 0.4 g, 12 週齢雌: GIRK2^{floxed} マウス: 20.2 ± 0.5 g, DAT^{cre} マウス: 19.9 ± 0.4 g, GIRK2^{DATKO} マウス: 19.4 ± 0.6 g) (Fig. 16).}

Body weight

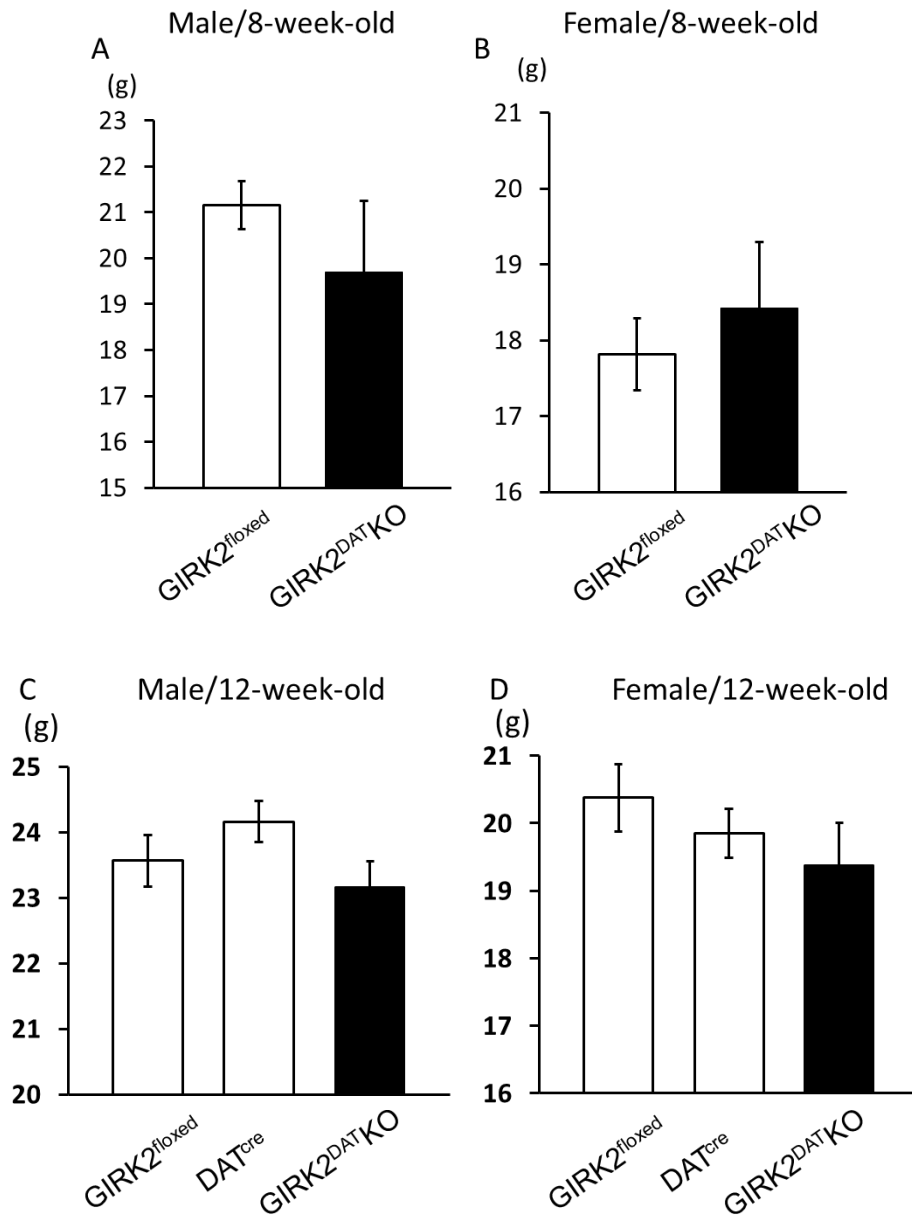


Fig. 16 Body weight of GIRK2^{DATKO} and control mice at the age listed

A,B. GIRK2^{flxed} (male:n=8,female:n=7), and GIRK2^{DATKO} (male=8,female=6)mice . The vertical bar of each column shows the standard error of the mean.

C,D. GIRK2^{flxed} (male:n=3,female:n=4), DAT^{cre} (male=5,female=7), and GIRK2^{DATKO} (male=3,female=3) mice. The vertical bar of each column shows the standard error of the mean.

第 2 項 GIRK2^{DATKO} マウスの免疫組織化学的解析

本研究で用いた DAT-Cre マウスは，胎生 15 日に，腹側被蓋野及び黒質緻密部領域において Cre リコンビナーゼを発現することが報告されている⁶⁷⁾．本項では GIRK2^{DATKO} マウスにおいて，腹側被蓋野及び黒質領域において，GIRK2 およびドパミンなどのカテコールアミン神経のマーカとして広く使用される TH との蛍光免疫二重染色法を用いて，本領域のカテコールアミン神経において GIRK2 が欠損しているか検討した．その結果，GIRK2^{DATKO} マウスの腹側被蓋野及び黒質領域において，GIRK2 の発現が顕著に低下していることが確認された (Fig. 17)．

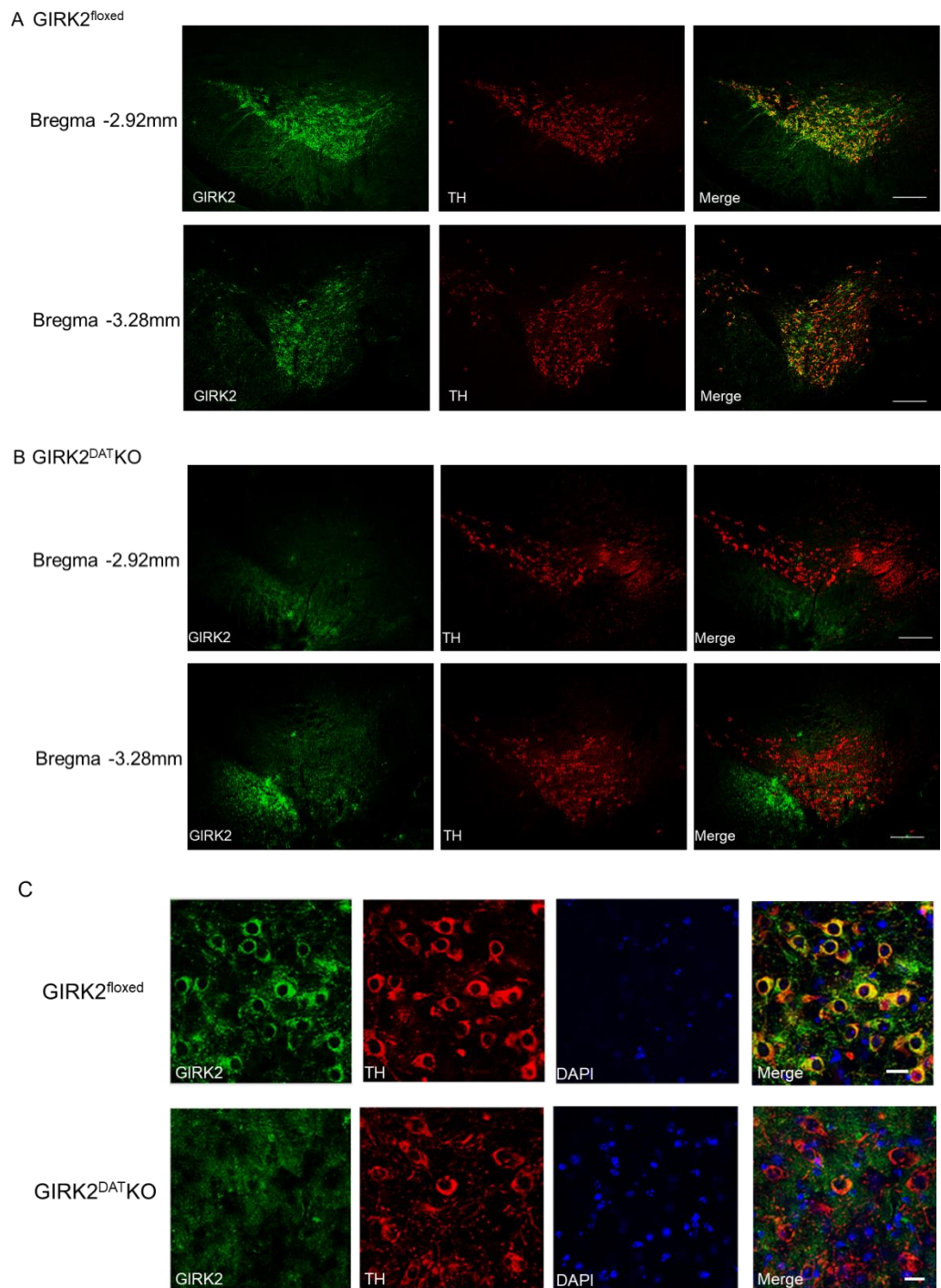


Fig. 17 Expression of GIRK2 protein in the brain.

Microscopy showing immunohistochemistry for GIRK2 (green) and TH (red) in the midbrain in sections from GIRK2^{flxed} mice (A) and GIRK2^{DATKO} mice (B). Scale bar is 200 μ m.

C. Microscopy showing immunohistochemistry for GIRK2, TH and DAPI (blue) in the midbrain (bregma -2.92 mm) under high magnification. Scale bar is 20 μ m.

第3項 GIRK2^{DATKO}マウスの急性単離腹側被蓋野ニューロンに対する電気生理学的解析

腹側被蓋野のドパミンニューロンの細胞体や樹状突起上にはオートレプターのドパミン D₂ 受容体が発現しており⁶⁸⁾, それと共役関係にある GIRK2 と GIRK3 がヘテロマーとして発現していることが報告されている⁶⁹⁾. また, ドパミンニューロンに発現している GIRK チャンネルは GABA_B 受容体とも共役していることが知られている⁶⁹⁾.

本項では GIRK2^{DATKO} マウスおよび GIRK2^{floxed} マウスの腹側被蓋野領域から単一ニューロンを急性単離し, まず, 電気生理学的にドパミンニューロンを同定した. すなわち, ドパミンニューロンには I_h チャンネルが発現している⁷⁰⁾ので, -60 mV から -140 mV までの過分極ステップパルス (20 mV 間隔) により誘発される過分極活性化電流 (I_h) を指標に同定した (Fig. 18). GIRK2^{floxed} マウスおよび GIRK2^{DATKO} マウスの腹側被蓋野急性単離ニューロンの I_h 電流は, それぞれ 228.6 ± 34.2 pA および 215.8 ± 58.7 pA であり有意な差はなかった.

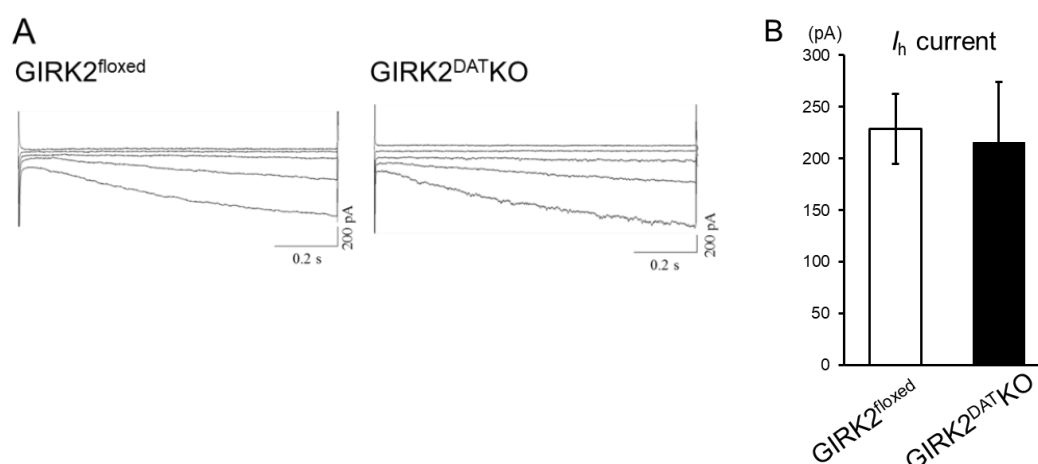
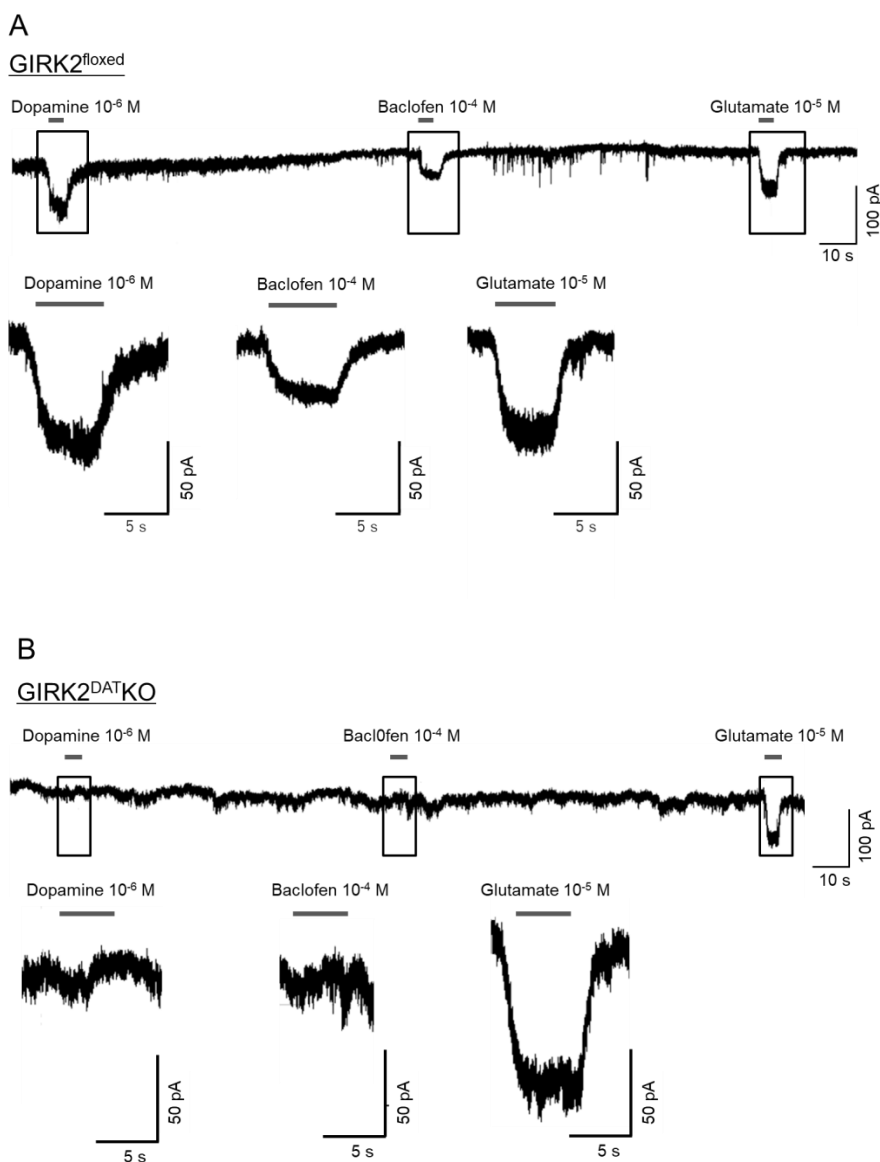


Fig. 18 Electrophysiological identification of the DA neuron in VTA.

- A. Representative I_h current traces of DA neurons in the VTA.
- B. Summary of I_h currents in VTA neurons from GIRK2^{floxed} mice and GIRK2^{DATKO} mice.

次に、GIRK2^{flxed} マウスの腹側被蓋野急性単離ニューロンにおいて、本分野でこれまで GIRK チャンネル活性化電流を測定している条件である、細胞外 K⁺ 濃度 20 mM の条件下で、膜電位を -80 mV に固定し、dopamine 10⁻⁶ M を投与すると濃度依存的に内向き電流 (I_{DA}) が誘発され、その値は 127.7 ± 22.7 pA であった。GABA_B 受容体アゴニストである、baclofen (10⁻⁴ M) では、114.4 ± 29.9 pA の内向き電流が惹起された。さらに、グルタミン酸 10⁻⁵ M によって 85.4 ± 16.8 pA の内向き電流が記録された (Fig. 19)。一方、GIRK2^{DATKO} マウスの腹側被蓋野急性単離ニューロンにおいては、ドパミン (10⁻⁶ M) および baclofen (10⁻⁴ M) によって誘発された内向き電流はそれぞれ 10.5 ± 2.3 pA および 9.2 ± 2.9 pA であり、GIRK2^{flxed} マウスの細胞と比較し、顕著に減少した。一方、グルタミン酸による内向き電流は 141.7 ± 24.7 pA であり、GIRK2^{flxed} マウスにおける電流と有意な差は認められなかった (Fig. 19)



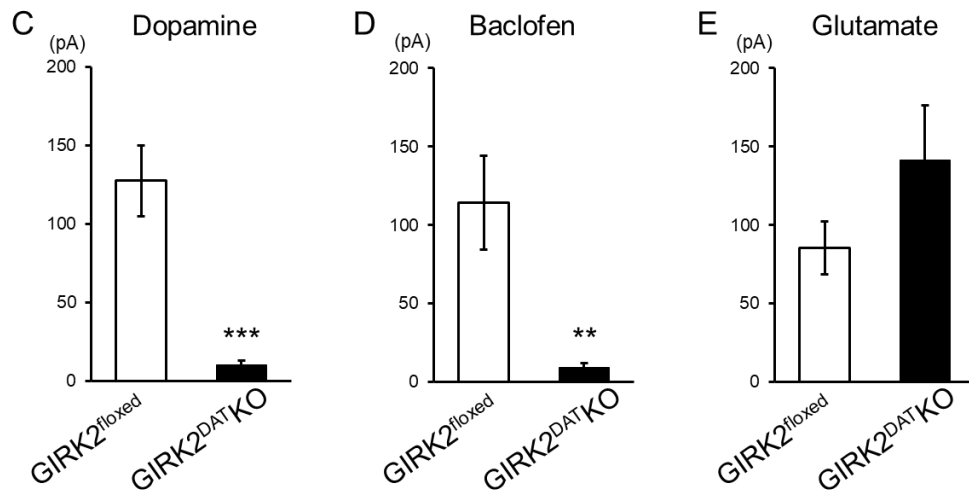


Fig. 19 Responsiveness to each substance of VTA neurons dissected from GIRK2^{flxed} mice and GIRK2^{DATKO} mice.

Representative currents evoked by dopamine (10^{-6} M), baclofen (10^{-4} M) and glutamate (10^{-5} M) in putative VTA dopamine neurons from GIRK2^{flxed} mice (A) and GIRK2^{DATKO} mice (B). All recordings were performed in an external solution containing 20 mM of K⁺ at a V_H of -80 mV in voltage-clamp conditions. Summary of dopamine (10^{-6} M) (C), baclofen (10^{-4} M) (D) and glutamate (10^{-5} M) (E) - induced currents in putative VTA dopamine neurons from GIRK2^{flxed} mice (7 neurons from 6 mice) and GIRK2^{DATKO} mice (9 neurons from 6 mice). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs. GIRK2^{flxed} mice group with Student's *t*-test.

第 4 項 GIRK2^{DATKO} マウスの行動薬理的解析

前項までで GIRK2^{DATKO} マウスは、対照群の GIRK2^{foxed} マウスや DAT^{cre} マウスとの間で外見上の違いはみられず、体重にも違いはないが、電気生理学的に GIRK チャンネルを介する電流が消失していることを明らかにした。そこで本項では、GIRK2^{DATKO} マウスのうつ様行動に与える影響を強制水泳試験法で調べた。次いで、自発運動能力についてオープンフィールド試験法で検討した。その結果、興味深いことに強制水泳試験において、GIRK2^{DATKO} マウスは、GIRK2^{foxed} マウスと比較し 8 週齢で 71.5 %、12 週齢で 51.2 % の無動時間の有意な短縮がみられた (8 週齢 : GIRK2^{foxed} マウス : 83.6 ± 11.0 秒, GIRK2^{DATKO} マウス : 23.8 ± 9.5 秒, 12 週齢 : GIRK2^{foxed} マウス ; 136.0 ± 15.7 秒, DAT^{cre} マウス : 141.8 ± 7.6 秒, GIRK2^{DATKO} マウス : 68.0 ± 18.1 秒)。一方、GIRK2^{DATKO} マウスと二つのコントロール群 (GIRK2^{foxed} マウス, DAT^{cre} マウス) の間で、自発運動量に有意な差は認められなかった (Fig. 20)。

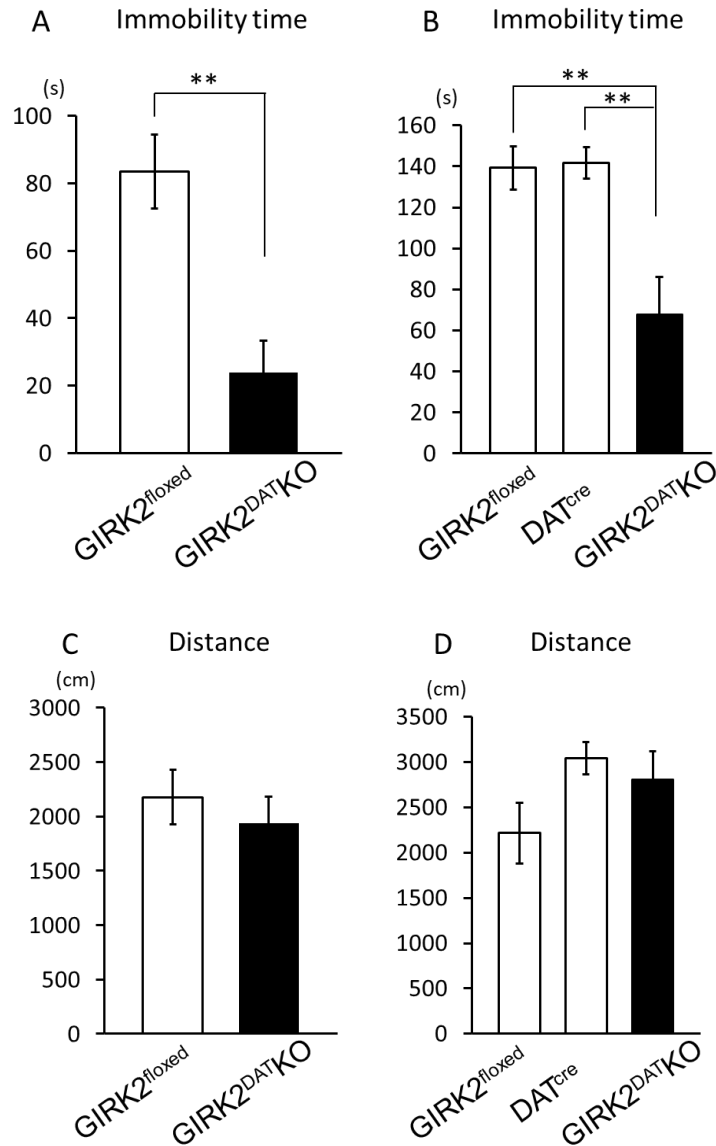


Fig. 20 Effect of deletion of GIRK2 in the forced swimming and the locomotor activity

A. Effect of deletion of GIRK2 on the immobility time in the forced swimming test in 8-week-old GIRK2^{flxed} and GIRK2^{DATKO} mice. The vertical bar of each column shows the standard error of the mean. (n=8) Data are analyzed by one-way ANOVA, followed by Student's t-test. **p<0.01

B. Effect of deletion of GIRK2 on the immobility time in the forced swimming test in 12-week-old GIRK2^{flxed}, DAT^{cre} and GIRK2^{DATKO} mice. The vertical bar of each column shows the standard error of the mean. (n=6-12) Data are analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test. **p<0.01

C. Effect of deletion of GIRK2 on the locomotor activity in 9-week-old GIRK2^{flxed} and GIRK2^{DATKO} mice. The locomotor activity was measured in the open field. The vertical bar of each column shows the standard error of the mean. (n=8) Data are analyzed by one-way ANOVA, followed by Student's t-test.

D. Effect of deletion of GIRK2 on the locomotor activity in 13-week-old GIRK2^{flxed}, DAT^{cre} and GIRK2^{DATKO} mice. The locomotor activity was measured in the open field. The vertical bar of each column shows the standard error of the mean. (n=6-12) Data are analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test.

第5項 GIRK2^{DATKO} マウスの各脳領域におけるドパミン量の定量

これまで、GIRK2^{DATKO} マウスの DA ニューロンの起始核における腹側被蓋野で種々の神経化学的、行動学的検討を行ってきた。GIRK2^{DATKO} マウスにおいて、DA ニューロンの投射先である側坐核 core および shell, 線条体, 前頭皮質におけるドパミンレベルが変動するか ELISA 法にて検討を行った。

検討した4つの領域において、GIRK2^{flxed} マウスと GIRK2^{DATKO} マウスにおいて、ドパミン含有量の有意な変動はなかった (Fig.21)。

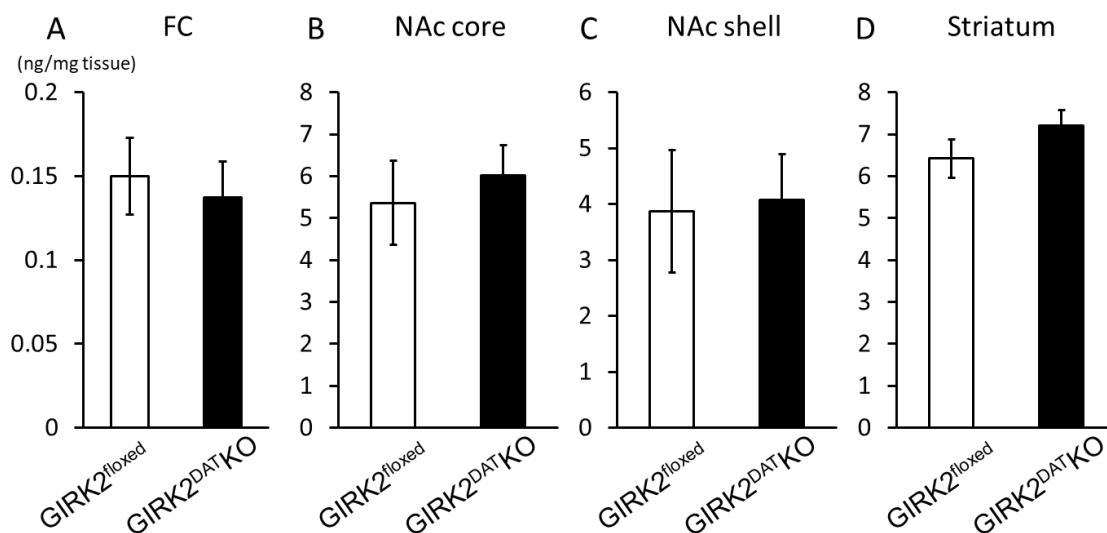


Fig. 21 Dopamine level of various regions dissected from GIRK2^{flxed} mice and GIRK2^{DATKO} mice.

Dopamine level of various regions dissected from GIRK2^{flxed} mice and GIRK2^{DATKO} mice in the frontal cortex (A), the nucleus accumbens core (B), the nucleus accumbens shell (C), and striatum (D). Values represent as the mean \pm SEM. (n=5)

第3節 考察

本章では **GIRK2^{DATKO}** マウスを作成し、このマウスの表現型について、基本的なデータを収集した。その結果、検討した以下の項目、すなわち、**GIRK2^{DATKO}** マウスの出生の雌雄の割合、体型・毛並などの外見、体重、および自発運動において、コントロール群のマウスとの間で有意な違いはないことが分かった。興味深いことに、抗うつ薬の評価系として信頼性が高く頻用されている強制水泳試験において **GIRK2^{DATKO}** マウスはコントロール群と比較し、顕著に短い無動時間を示した。すなわち、腹側被蓋野-側坐核系を中心とした **DAT** を発現している **DA** ニューロンにおける **GIRK2** の欠損によりうつ様行動が顕著に減弱することが示された。

本研究で使用した、**DAT-Cre** マウスは腹側被蓋野および黒質領域で **Cre** リコンビナーゼを発現することが報告されている⁶⁷⁾。その投射先での **DAT** の発現レベルは、線条体および側坐核内の **lateral shell** で多く、次いで側坐核内の **medial shell**, **core** 領域でも認められ、扁桃体や内側前頭皮質では少ない⁷¹⁾。このことから、腹側被蓋野-側坐核系および黒質-線条体系で強く **GIRK2** の欠損が起きていると推察される。

本分野ではこれまでに、1) **GIRK** チャネル抑制作用をもつチペピジンが正常および治療抵抗性うつ病モデル動物において抗うつ様作用を有すること^{29,72)}、2) これらの薬物がセロトニン合成阻害薬 **para-chlorophenylalanine (PCPA)** ではなく、カテコールアミン合成阻害薬の **α -Methyl-p-tyrosine (AMPT)** の前処置によって、チペピジンの抗うつ様作用が消失すること^{29,73)}、3) 各種受容体遮断実験により、ドパミン **D₁** 受容体遮断薬である **SCH23390** の前処置で抗うつ様作用が消失すること^{29,73)}、4) チペピジンの抗うつ様作用は側坐核への **SCH23390** の局所投与によって消失すること²⁹⁾、5) チペピジンの腹側被蓋野への局所投与により、抗うつ様作用が発現すること²⁹⁾を報告しており、これらの知見と併せて考えると、腹側被蓋野における **GIRK** チャネルシグナルの消失によって **GIRK2^{DATKO}** マウスの強制水泳試験における無動時間の短縮が見られたと考えられる。

近年、オプトジェネティクスを用いた研究により、腹側被蓋野-側坐核系のドパミンニューロンがうつ様行動に深く関与していることが報告されている^{74,75)}。しかしながらこれらの報告は、かなり複雑である。まず、正常なマウスの腹側被蓋野ドパミンニューロンにハロロドプシンを発現させ、尾懸垂試験中においてこのニューロンを抑制させると、もがき反応が低下することが報告されている⁷⁴⁾。慢性緩和ストレス (**chronic mild stress**) においては、腹側被蓋野-側坐核経路のドパミンニューロンをオプトジェネティクスにより活性化することで抗うつ様作用が発現することが報告されている⁷⁴⁾。一方で、社会的敗北ストレス (**social defeat stress**) を受けて、うつ様行動を示す **susceptible** となったマウス (反対にうつ様行動を示さないマウスは **resilient** と呼ぶ) は、この経路の **phasic firing** が増加 (**tonic firing** は未変化) しており、**resilient** マウスにおいて、オプトジェネティクスを用いて **phasic firing** を増加させると、**susceptible** と同様うつ様行動を示すことが報告されている⁷⁵⁾。

これらの報告は共に、うつ様行動において腹側被蓋野-側坐核系のドパミンニューロンが重要な役割を果たしていることを示しているが、その結果は相反するもので、stressの種類に起因するものと考えられる。本研究では、腹側被蓋野-側坐核系のドパミンニューロンを含んだ GIRK2 の欠損により、抗うつ様作用が発現することを示した。一方で、GIRK2^{DATKO} マウスは、ドパミンニューロンで GIRK2 サブユニットを欠損しているが、そのニューロンの投射先である側坐核を ELISA 法で予備検討した結果、ドパミンレベルの増加は認められなかった。これらのことを踏まえると、強制水泳試験という急激なストレス環境下においてドパミンニューロンを調節する脳回路が存在することが示唆される。近年、分界条床核から腹側被蓋野の抑制性 (GABA) 介在ニューロンに対して抑制性の投射が報告されている⁷⁶⁾。この腹側被蓋野の GABA 介在ニューロンは、腹側被蓋野ドパミンニューロンに対して抑制を行っている。分界条床核から腹側被蓋野への投射経路は、痛みなどの嫌悪刺激において遊離されるノルアドレナリンによって抑制されることが報告されている⁷⁷⁾。分界条床核の電氣的破壊によっては、強制水泳試験において無動時間が延長するという報告があり^{78,79)}、分界条床核からの腹側被蓋野 GABA 介在ニューロンへの投射が強制水泳試験ストレスにおいても役割を持つ可能性がある。すなわち、強制水泳試験における嫌悪な刺激によって、分界条床核から腹側被蓋野への投射ニューロンの抑制がおき、その後腹側被蓋野内での GABA 介在ニューロンの脱抑制後、腹側被蓋野ドパミンニューロンの抑制が起きるといふ神経回路である。GIRK2^{DATKO} マウスにおいては、腹側被蓋野 GABA 介在ニューロンからのドパミンニューロンに対する GABA を介した抑制機構が消失しているため、強制水泳試験における無動時間の短縮が見られた可能性が考えられる。この件については、GIRK チャンネル抑制作用をもつチペピジンなどの場合、数々の薬理的、行動科学的、神経化学的実験に基づき、腹側被蓋野の GIRK チャンネルの抑制を介して、側坐核に投射するドパミンニューロンが活性化され、そのことが抗うつ様作用をもたらすことが示唆されている。今後、GIRK2^{DATKO} マウスの強制水泳試験における短い無動時間がドパミン D₁ 受容体の遮断薬で如何に影響を受けるのかという実験を含めて、さらに研究することが必要である。

GIRK2^{DATKO} マウスにおけるうつ様行動の減少率と、本研究室でこれまでに得られたチペピジンの ddY 系統雄性マウスでの抗うつ様作用の評価⁸⁰⁾との比較を行うと、GIRK2^{DATKO} マウスでのうつ様行動減少率はコントロールに対し 8 週齢で 71.5 %、12 週齢で 51.2 %程度であるのに対し、強制水泳試験 30 分前のチペピジン 20 mg/kg および 40 mg/kg の皮下投与はそれぞれ 70.5 %、100 %に近い抑制であった。マウスの系統差があるため一様に評価はできないが、チペピジン 40 mg/kg 投与時には、GIRK2^{DATKO} マウスより強いうつ様行動の減少が現れていると考えられる。

ところで、GIRK2^{DATKO} マウスは、本研究と同一の exon を含む領域を loxP で囲みこんだマウス (floxed マウス) と、同一系統の DAT-Cre マウスを使用し作製された報告がある^{81,82)}。この報告では GIRK2^{flox} マウスは、BA1 (129SvEv と C57BL/6 のハイブリッド) ES 細胞株で作製されているため、若干のゲノムの違いはあるかもしれないが、腹側被蓋野ドパ

ミンニューロンにおけるスライスパッチクランプ法にて $GABA_B$ 受容体およびドパミン D_2 受容体媒介の **GIRK** チャネル活性化電流の消失に加え，雄では観察されていないが，雌での有意な自発運動量の亢進や，雌雄どちらにおいてもモルヒネやコカインなどの乱用薬物による自発運動量の増加が認められている^{81,82)}が，うつ様行動に関する報告はない。

また，本研究では既存のうつ病治療薬が主なターゲットとしているトランスポーターや受容体ではなく，チャネル分子の欠損により抗うつ様の表現型を示したことを明らかにした。**GIRK** チャネルと同様に，カリウムイオンチャネルである **two-pore-domain K^+ (K_2P)** チャネルの **TREK-1** チャネルの欠損マウスにおいて強制水泳試験において無動時間の短縮や，拘束ストレスによるストレス応答に抵抗性を示す，抗うつ様の表現型をもつことが報告されている⁸³⁾。ちなみに中枢性鎮咳薬の **TREK-1** に対する選択性は **GIRK** チャネルと比較するとかなり弱いという知見を本研究室では得ている⁸⁴⁾。これらのことを踏まえると，チャネル分子は未だうつ病治療薬のターゲットとなり得ていないが，本研究は，**GIRK** チャネルのようなチャネル分子を新しい標的としたうつ病治療薬の開発が十分可能であることを示唆しており，**GIRK** チャネル阻害作用をもつチペピジンはその初めての薬物になる可能性が示唆されたと言える。

第5章 総括

現代社会における医療上最も重要な課題の一つは、うつ病をはじめとした精神疾患への対策であるといえよう。しかしながら、その病態の複雑さ故に多くの問題が山積みにされたままであり、既存の着想で精神疾患の現状を打破する医薬品設計には限界があり、事実多くの製薬会社が精神科領域における治療薬開発から撤退した^{85,86)}。この問題を解決するためには、更なる病態解明やバイオマーカーを含む診断技術の発達による患者の詳細な病態の分類や、病態の進行度に応じた層別化、そしてそれぞれに対応する治療法の確立が必要であると考えるが、現代の科学的技術がこの点に達していない以上、新たな視点からの創薬が間違いなく必要である。

ところで高濱らは、チペピジンをはじめとした中枢性鎮咳薬が、GIRKチャンネル抑制作用を介し、新規の中枢疾患治療薬となりうる、との仮説を提唱してきた。この仮説を実証するため、第一に、GIRK2コンディショナルノックアウトマウスの作製に取り組んだ。第二に、中枢性鎮咳薬に共通に見られるうつ様行動の減少が、GIRK2^{nes}KOマウス、GIRK2^{DAT}KOマウスにおいても再現できるか検討を行った。

以下に得られた知見を総括する。

第2章

- ・ *Girk2/Kcnj6*^{floxed/floxed}マウス作製のターゲティングベクターをエレクトロポレーションにより導入したES細胞のコロニーを、1176個ピックアップし、PCR法とサザンブロット法によってスクリーニングした。その結果、相同組換え体の検出に至らなかった。
- ・ 次に、CRISPR/Casシステムを用いて、ターゲティングベクターの5' armと3' armにあたる領域にnickを導入し、ES細胞の単離、スクリーニングを行った。その結果、72個の候補クローンから、試した3種類すべてのサザンブロット法において陽性のバンドが検出されたコロニー7個を単離することに成功した。
- ・ これら7個のクローンのうち、6個のクローンを熊本大学生命資源・研究支援センター疾患モデル分野（山村研一教授、荒木喜美准教授、平成26年から教授）に依頼した。その結果、5つのラインのキメラマウスの作製に成功した。
- ・ さらに2個のクローンから、*neo*遺伝子をFlpリコンビナーゼ発現ベクターによりES細胞レベルで除去し、熊本大学生命資源・研究支援センター疾患モデル分野に依頼し、5つのサブラインの作製に成功した。

第3章

- ・ 得られたキメラマウスより、GIRK2^{floxed}マウスとNestin-Creマウスとを交配させるこ

とによって **GIRK2^{nes}KO** マウスを作製した。

- **GIRK2^{nes}KO** マウスにおいて、うつ様行動の評価を強制水泳試験にて行った。その結果、**GIRK2^{nes}KO** マウスはコントロール群 (**GIRK2^{flxed}** マウスおよび **Nestin^{Cre}** マウス) と比較しうつ様行動が著しく減少した。また、**GIRK2^{nes}KO** マウスはコントロール群と有意な運動量の差は認められなかった

第4章

- **GIRK2^{flxed}** マウスと **DAT-Cre** マウスと交配させることにより **GIRK2^{DAT}KO** マウスを作製した。
- **GIRK2^{DAT}KO** マウスにおいては、腹側被蓋野および黒質領域で **TH** と **GIRK2** の共局在が消失した。
- **GIRK2^{DAT}KO** マウスの腹側被蓋野より急性単離したドパミンニューロンにおいて、 I_h 電流およびグルタミン酸投与による内向き電流は、**GIRK2^{flxed}** マウスと同様に見られた。しかし、ドパミンおよび **GABA_B** 受容体アゴニストであるバクロフェンに対する応答は消失した。
- **GIRK2^{DAT}KO** マウスにおいて、うつ様行動の評価を強制水泳試験にて行った。その結果、**GIRK2^{DAT}KO** マウスはコントロール群と比べてうつ様行動の指標である無動時間が著しく減弱がみられた。また、オープンフィールドで調べた **GIRK2^{DAT}KO** マウスの運動量は、コントロール群と比べて有意差は認められなかった。

本研究において、脳、およびドパミンニューロンにおける **GIRK2** の欠損は、うつ様行動の減少の表現型を示すことを明らかにした。**GIRK2** の欠損がどのように生体に影響を与えているか、詳細な検討は今後必要ではあるが、少なくとも中枢性鎮咳薬の作用点にドパミンニューロンの **GIRK** チャンネルが関与していることが示唆された。近年、側坐核ドパミンレベルを上昇させる電気けいれん療法⁸⁷⁾やエンリッチ環境飼育⁸⁸⁾は種々の難治性脳疾患患者や動物モデルでの症状改善が報告され⁸⁹⁻⁹³⁾、また側坐核への深部脳刺激が治療抵抗性うつ病や強迫性障害において改善作用をもつことも報告されている^{94,95)}。これらの報告を踏まえると側坐核は種々の難治性中枢疾患治療に有望な作用点である可能性がある。本研究では緒論でも述べたように、中枢性鎮咳薬は様々な難治性中枢疾患モデル動物に対し改善作用を示すことを報告してきていることから、今後本マウスを用いて不安障害やメタンフェタミン誘発多動等の評価を行うことは重要な課題である。また、**GIRK2^{nes}KO** マウスと **GIRK2^{DAT}KO** マウスの無動時間短縮作用を比較すると、同週齢では有意ではないが **GIRK2^{nes}KO** マウスでの影響の方が大きかった。これらは、セロトニンニューロンの起始核である縫線核やノルアドレナリンニューロンの起始核である青斑核における **GIRK2** の欠損に起因するものと考えているが、これらの領域がどの程度うつ様行動に関与しているかは他の **Cre** 発現マウスや、**Cre** リコンビナーゼを発現するウイルスベクター等を局所投与

することによって検討していくことが必要である。

一方で、本研究において着目してきたドパミンニューロンのうち特に腹側被蓋野-側坐核系のドパミンニューロンは、薬物の依存形成に深く関わる領域であることは広く知られている。GIRK チャンネルを制御する中枢性鎮咳薬も依存形成薬と同様に側坐核においてドパミン遊離量を増加させる。しかし、チペピジンの開発者である加瀬（当時：熊本大学薬物学教室）らの研究において、チペピジンを犬に 100 日間以上連投しても全く耐性をとらないことが分かっている⁹⁶⁾。何より、チペピジンは承認より 50 年以上が経過し、今でも特に小児領域で鎮咳薬として処方され、重篤な副作用がほとんど報告されていないことから安全性が極めて高い薬であるといえる。これらのチペピジンと依存形成薬の間に、どのような違いがあるかは興味深い課題である。GIRK2 欠損マウスにおいて、コカイン依存性関連行動である自己投与行動が減少すること⁹⁷⁾、メタンフェタミン嗜好性を抑制する抗うつ薬のフルオキセチンや脳循環・代謝改善薬のイフェンプロジルは GIRK チャンネル抑制効果を有し、メタンフェタミン嗜好性を抑制しないフルボキサミンは GIRK チャンネル抑制効果を有さないことが報告されている⁹⁸⁾。さらに本研究室においては、依存形成薬である覚醒剤や麻薬は、GIRK チャンネル抑制作用はない、あるいは顕著に弱いことを見出している。そして、非常に興味深いことに、腹側被蓋野と側坐核をさらに亜集団に分類し、中枢性鎮咳薬と依存形成薬の興奮させるニューロンを詳細に解析したところ、これらの薬物は明らかに違う領域で神経細胞を興奮させていることを報告している⁶⁶⁾。

緒論でも述べたように、新規抗うつ薬としては (1) 治療抵抗性のうつ病に対して抗うつ様作用（これまでと異なるメカニズム）を有し、(2) 抗うつ様作用の発現が早く、(3) 副作用の少ない治療薬の開発が望まれている。本研究で開発を目指すチペピジンはこれまでに、治療抵抗性うつ病モデルに対する抗うつ様作用や、嗅球摘出ラットにおける即効作用を発揮しており、さらには臨床において小児領域で 50 年以上使用されている薬物である。本研究は、このチペピジンの作用が GIRK チャンネルを介することを証明するうえで重要な知見であると考えられる。一方で、GIRK2^{nes}KO や GIRK2^{DAT}KO マウスは、強制水泳試験においては無動時間の有意かつ大幅な減少が起きるため、この評価系においてチペピジンを投与した際に、さらなる抗うつ様作用が発現するか否かを検討することが難しかった。今後、これらの GIRK2 欠損マウスに、うつ病モデル動物として研究が進む慢性緩和ストレスや、社会的敗北ストレスを与えることで、うつ様行動にどのような変化が起きるか検討していくことも必要だろう。

また、チペピジンの創薬という点で考察を加えると、緒論でも述べたようにチペピジンは、既存薬が三剤しか存在しない ADHD および SSRI や SNRI などの既存薬の使用が限定的となる青年期うつ病、および治療抵抗性うつ病においてオープンラベル試験で改善作用をもつことが報告された⁴⁷⁾。医療経済研究機構と国立精神・神経医療研究センターの調査によると、13 歳から 18 歳に対する処方数で 2002 年から 2004 年の 3 年間と 2008 年から 2010 年の 3 年間との比較で、ADHD 治療薬が 2.49 倍に増加していると報告され、その患

者数の増加が深刻な問題である。元来、小児の鎮咳薬として半世紀の臨床実績をもつチペピジンは、これらのアンメットニーズを満たす治療薬となりえる可能性を十分に秘めている。さらには、医薬品開発において省資源・省コスト、開発期間の短縮を可能にする、ドラッグリプロファイリングの観点からも重要な意味をもつだろう。

GIRK チャンネルを標的とした創薬やその研究は、今ようやく黎明期を迎えたばかりである。本研究室以外からも、うつ病^{99,100}、不安⁴⁵、依存^{101,102}、痛み^{103,104}、認知機能^{105,106}、など多くの疾患との関わりが少しずつ垣間見えてきた。その先にある **GIRK** チャンネルの果たす本質的な役割は何か、本研究において作製された遺伝子改変マウスを用いて、それらの解が少しでも導かれること、ひいてはこれらの研究が難航する精神疾患治療薬開発の一助となることを筆者は期待している。

実験の部

すべての動物実験および遺伝子組み換え実験は、熊本大学動物実験委員会および熊本大学遺伝子組換え生物等第二種使用等安全委員会の承認を受け、熊本大学の動物実験のガイドラインに従って実施した。

1. 実験動物

動物は、熊本大学薬学部実験動物研究施設にて、室温 23 ± 1 °C, 12:12 の明暗サイクル (8:00 点灯, 20:00 消灯) の環境下で飼育した。固形飼料 (ラボ MR ストック, 日本農産工業株式会社) および飲料水は自由に摂取させた。動物は熊本大学および日本薬理学会の実験動物取り扱い規則に従って実験に供した。

2. 試薬

本研究に使用した主な試薬を以下にまとめて記した。

第2章

TaKaRa LA Taq® [TaKaRa], Go Taq® Green Master Mix [Promega], KOD-Fx[TOYOBO] , G418 Disulfate aqueous Solution, Proteinase K [以上 Nacalai tesuque], Alkaline Phosphatase (Bovine intestine), KpnI, NsiI, PstI, , XhoI [以上 Nippon Gene], Tween 20, Phosphate Buffered Saline, 0.25 % Trypsin-EDTA solution, [以上 SIGMA], 2 - Mercaptoethanol, pyruvate [以上 WAKO], Amersham CDP- Star™ detection reagent [GE Healthcare Life Science], Blocking reagent, DIG DNA Labeling and Detection Kit [以上 Roche Diagnostics], QIAquick® Nucleotide Removal Kit [QIAGEN]

第3および4章

Pronase [Calbiochem], Thermolysin, Nystatin, Dopamine hydrochloride, Baclofen, L-Glutamic acid [以上 SIGMA]

その他の試薬および無機塩類は市販の特級品を使用した。

3. プライマー

プライマーは北海道システム・サイエンス株式会社に合成を依頼した.

shselect1; ACTTCGGAATAGGAACTTCAAGATCC (26 mer)
shselect2; CAAGTATCACTGTTAATTATCATAAAGAGG (30 mer)
shselect3; GAGCAGGTACAGAGTGACAG (20 mer)
shselect4; AAGAGTCCAAATGAGATGTTGG (22 mer)
select-neo (-); CCATCAGAGCCAAGTTGATCAAGTCC (26 mer)
select-neo (-); CCAGAGCCTACTGTACCTCAACC (23 mer)
shvec1; CAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG (25 mer)
shvec1; GGGATGAGAGACAGATATACATTTATCCC (29 mer)
RT-GIRK2-S; GAAATTAACCAACAGAGTCCCTTC (24 mer)
RT-GIRK2-AS; GTTAGCCAGCTCCGCTAGCTCTTT (24 mer)
RT- β -actin-S; GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA (21 mer)
RT- β -actin-AS; CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC (24mer)
IMR6625; TGGCTGTTGGTGTAAAGTGG (20 mer)
IMR6626; GGACAGGGACATGGTTGACT (20 mer)
IMR8292; CCAAAGACGGCAATATGGT (20 mer)

4. 実験方法

第2章

1. ES 細胞培養法

ES 細胞の培養に用いた溶液類の調製には超純水製造装置 (Milli-Q Labo, MILLIPORE) により精製した超純水を使用し、器具類はすべて、洗剤を用いずに水道水、蒸留水そして超純水により入念に洗浄した後に、オートクレーブにより滅菌を施したものを使用した。培養用のディッシュはすべて 0.1 % gelatin をコートして 5 分間以上経過したものを使用した。

また、すべての操作は、クリーンベンチ内で無菌的に行った。

・ Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM) 調製法

ES 細胞の培養を行うにあたり、本研究では培地に GMEM を用いた。GMEM の調製法を以下に示す。

GMEM [12.52 g / L, SIGMA] を超純水にて溶解し、Sodium carbohydrate [2.75 g / L, WAKO], 2-Mercaptoethanol [7 μ L / L, WAKO], Pyruvate [0.11 g / L, WAKO] を添加した。スターラーによって 4 時間以上攪拌した後、フィルター [7105 Bottle Top Filter, 0.22 μ m, FALCON] を用いて濾過滅菌して使用した。

・ ES 細胞培養法

液体窒素より ES 細胞を取り出し、42 °C に温めた超純水中でできるだけ速やかに融解した後、15 % Fetal Bovine Serum (FBS) を含んだ GMEM [以下 FBS-LIF (-) medium] により中和、懸濁した。これを 4 °C, 800 rpm の条件下で 5 分間遠心した後、上清を除去し、得られたペレットをタッピングしてほぐし、14 % Knockout Serum Replacement (KSR), 1 % FBS, Non-essential amino acid (NEAA), Leukemia inhibitory factor (LIF) を含む GMEM [以下 KSR medium] に再懸濁し、培養用 6 cm ディッシュ 1 枚に播種後、6.5 % CO₂, 37 °C の条件下で静置培養した。その後、培養用 10 cm ディッシュにコンフルエントの状態まで培養し、10 cm ディッシュ 1 枚 (ca. 3-4 \times 10⁶ cells) の ES 細胞につき 1 回のエレクトロポレーションに用いた。

なお、長期培養する際は最低 2 日に 1 回は培地交換を行い、薬剤選択中の場合を除き、3 日に 1 回は必ず継代を行った。

2. ES 細胞への遺伝子導入法

(1) ターゲティングベクターの精製

ターゲティングベクターを 50 mL の培養液から QIAGEN® Plasmid Maxi Kit [QIAGEN]を用いて大量に調製し、1 回のエレクトロポレーションにつき 40 μ g を制限酵素 KpnI により消化し線形化を行った。アガロースゲル電気泳動法によって完全切断であることを確認した後、phenol / chloroform 抽出によりベクターを精製し、70 % ethanol により洗浄した。その後、エレクトロポレーションの直前に 100 % ethanol により脱水を行い、濾過滅菌した 20 μ L の TE に溶解して用いた。なお、CRISPR/Cas システムの同時導入の際には、ターゲティングベクターの線形化は行わず、環状のまま導入を行った。

(2) エレクトロポレーション

培養用 10 cm ディッシュにコンフルエントの状態まで培養した ES 細胞を Phosphate Buffered Saline (PBS)により 3 度洗浄した後、トリプシン処理により細胞を剥離し、FBS-LIF (-) medium により中和、懸濁し、4 $^{\circ}$ C、800 rpm の条件下で遠心した。上清を取り除いた後にペレットをタッピングにより軽くほぐし、0.7 mL の冷 PBS に再懸濁した後、丁寧にピペッティングを行い、細胞液を均一にした。線状化したターゲティングベクターを混合し、氷上で 10 分間インキュベートした後、電気穿孔法装置 (GENE PULSER® II, BIO-RAD)により 800 V、3.0 μ F の条件で電気パルスを与えた (Time const. ca. 0.03 - 0.05)。その後室温で 10 分間インキュベートした後、KSR medium に懸濁して培養用 10 cm ディッシュに播種後、5 % CO₂、37 $^{\circ}$ C の条件下で静置培養した。なお、CRISPR/Cas システムの同時導入の際には、予備的な検討により得られた複数のベクターの導入に最適な 400 V、125 mF の条件を採用し、電気パルスを与えた。

(3) ES 細胞コロニーのピックアップ

エレクトロポレーションの 24 時間後に、G418 (200 μ g / mL) を含んだ KSR medium に培地交換を行い、およそ 1 週間かけて薬剤選択を行った。選択開始後 2- 3 日間は 1 日 2 回程度、細胞数が減少してからは 2 日に 0.5- 1 回程度の培地交換を行い、エレクトロポレーション後 7-9 日間、コロニーが直径 1 mm 弱程度になるまで培養してピックアップした。コロニーは実体顕微鏡下においてイエローチップを用いてピックアップし、ひとつひとつトリプシン処理し、15 % FBS、1x NEAA、LIF を含んだ GMEM [以下 FBS-LIF (+) medium] により中和、懸濁した後、KSR medium を分注した 24 ウェルディッシュに播種した。

(4) ES 細胞の保存

ピックアップ後 2- 3 日間培養した後、ES 細胞を PBS により 3 度洗浄し、トリプシン処理を行った。細胞が十分に剥離したことを確認した後、保存液 (トリプシンを含めた時の

濃度で 10 % Dimethylsulfoxide (DMSO) と 33 % FBS を含んだ FBS- LIF (+) medium) に懸濁して, 70- 80 % を保存用 2 mL チューブに入れ, 残りを DNA 抽出用に KSR medium を分注した 12 ウェルディッシュに播種し培養した.

なお, 保存用の ES 細胞は-80 °C でゆっくりと凍結させ, その後 3 日以内に液体窒素内に移した.

3. ES 細胞ゲノム DNA 抽出法

ピックアップした ES 細胞の中から遺伝子組換え体を検出するために, それぞれの ES 細胞からゲノム DNA の抽出を行った. 抽出用に最大 3 日間培養した ES 細胞から培地を取り除き, PBS にて細胞を洗浄した. これに Lysis buffer (2 x SSC, 20 mM Tris- HCl; pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 % SDS, 20 mg / mL Proteinase K) を加え, 56 °C で 3 時間振盪, インキュベートした. この細胞可溶化物を 2 度 phenol/chloroform 処理することで夾雑タンパク質を除去した後, isopropanol 沈殿により得たペレットを 70 % ethanol により洗浄した. 遠心後, 上清を除去し, 100 % ethanol に置換し脱水した. 室温でペレットを乾燥させた後, 100 μ L の TE に溶解することで ES 細胞ゲノム DNA を得た.

なお, 全ての操作は, ゲノム DNA が切断されないように先端カットチップを用い, 攪拌は転倒混和により穏やかに行った.

4. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法

抽出した全てのゲノム DNA を 50 ng / μ L になるように希釈し, 1 回の PCR にそれを 1 μ L ずつ用いた.

PCRvec はプライマーに shvec1 と shvec2, ポリメラーゼに Go Taq® Green Master Mix [Promega] を使用し, (1 cycle at 94 °C for 5 min, 30 cycles at 94 °C for 0.5 min, 58 °C for 0.5 min, 72 °C for 0.5 min, 1 cycle at 72 °C for 7 min) の条件下にて行った. PCR-3' はプライマーに shselect1 と shselect2, ポリメラーゼに TaKaRa LA Taq® を使用し, (1 cycle at 94 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for 1 min, 58 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, 1 cycle at 72 °C for 7 min) の条件下において行った. 5'-loxP-PCR には, プライマーに shselect3 と shselect4, ポリメラーゼに KOD-Fx を使用し (1 cycle at 94 °C for 5 min, 30 cycles at 94 °C for 0.5 min, 58 °C for 0.5 min, 72 °C for 0.5 min, 1 cycle at 72 °C for 7 min) の条件下において行った. PCR-neo (-) には, プライマーに shselect5 と shselect6, ポリメラーゼに KOD-Fx を使用し, (1 cycle at 94 °C for 5 min, 30 cycles at 94 °C for 0.5 min, 58 °C for 0.5 min, 72 °C for 0.5 min, 1 cycle at 72 °C for 7 min) の条件下にて行った.

全ての PCR のポジティブコントロールには, 本分野の以前の研究により得られた組換え体 ES 細胞から抽出したゲノム DNA を使用した.

PCR の結果は 1.5 % アガロースゲルを用いて電気泳動法により確認した.

5. サザンブロットティング法

・標識 DNA プローブの調製

プライマーに shpro1 と shpro2, および shpro3 と shpro4, ポリメラーゼに TaKaRa LA Taq®を用いて PCR (1 cycle at 94 °C for 5 min, 30 cycles at 94 °C for 1 min, 67 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, 1 cycle at 72 °C for 10 min) を行い, 得られた PCR 産物を pGEM® T-easy に挿入した.

プラスミドを大量に調製し, NotI により切り出しておよそ 1 µg の DNA 断片を得た. この DNA 断片を用いて, DIG DNA Labeling Kit [Roche Diagnostics] にて標識を行った. まず, DNA 断片を超純水と混合し, 95 °C で 10 分間熱変性した後, 氷上で急冷した. その後, Hexanucleotide mix, DIG DNA labeling mixture, Klenow enzyme を混合したものをこれに加え, 37 °C で一晩インキュベートし, Random Primed DNA Labeling 反応を行った. 翌日この混合物を QIA quick® Nucleotide Removal Kit [QIAGEN] を用いて精製した.

・方法

ES 細胞より抽出したゲノム DNA を 3'側は PstI もしくは NsiI, 5'側は KpnI と XhoI により 37 °C で一晩インキュベートし, 消化した. 消化したゲノム DNA を ethanol 沈殿により精製し, 70 % ethanol により洗浄した後, TE と 6 x Dye の混合液に懸濁した. これを 0.9 % アガロースゲルでおよそ 90 ~ 120 分間, 50 V で電気泳動し, エチジウムブロマイド 1 µg / mL 溶液により染色した後, 泳動パターンの撮影を行った. このゲルを変性液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) に 5 分間浸して変性させた後, キャピラリー法にてナイロン膜 (Nylon membranes, positively charged [Roche Diagnostics]) に一晩かけて転写した. この膜をハイブリ・バック [Cosmo Bio Co., Ltd.] に封入し, Hybridization Buffer 1 (以下 HB, 5 x SSC, 0.02 % SDS, 0.1 % N-Lauroylsarcosine, 1 % Blocking Reagent) 中で, 65 °C, 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った. ついで, 95 °C で 5 分間熱変性した後, 氷上で急冷した標識 DNA プローブを, 煮沸した別の HB に加え (20 µg / mL), この中でさらに 65 °C, 一晩 (8-16 時間) ハイブリダイゼーションを行った. この膜を以下の手順で洗浄した.

- | | |
|--------------------------------|------------------------------|
| ①. 2 x SSC- 0.1 % SDS | 65 °C, 5 min x 2, 10 min x 1 |
| ②. 0.2 x SSC- 0.1 % SDS | 65 °C, 10 min x 4 |
| ③. Wash Buffer 1 | R.T., 5 min x 2 |
| ④. Hybridization Buffer 2 (B2) | R.T., 30 min 以上 |
| ⑤. Anti- DIG- AP- B2 | R.T., 30 min x 1 |
| ⑥. Wash Buffer 2 | R.T., 10 min x 2, 5 min x 2 |
| ⑦. Wash Buffer 3 | R.T., 5 min x 1 |

- ※ Wash Buffer 1 : 0.1 M Tris- HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl
- Wash Buffer 2 : 0.1 M Tris- HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 0.5 % Tween 20
- Wash Buffer 3 : 0.1 M Tris- HCl (pH 9.5), 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl₂
- B2 : 0.1 M Tris- HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 1 % Blocking reagent
- Anti- DIG- AP- B2 : Anti- DIG- Alkaline phosphatase Conjugate [Roche Diagnostics] 0.75 U / 20 mL B2

洗浄した後, CDP- Star™ [GE Healthcare Life Sciences] により抗体反応を検出した. 化学発光の検出には Bio-imaging analyzer LAS- 4000 [Fuji Film] を用いた.

6. RT-PCR 法

(1) 脳の摘出およびダイセクション

マウスをジエチルエーテルで麻酔し, 断頭した後速やかに脳を摘出し, 氷冷した sucrose ringer solution に 1 分間つけ, 血液をできるだけ除去した. 冷却後, 脳をカミソリ刃とピンセットで半脳にし, それぞれをトレフチューブに入れ液体窒素にて凍結後, -80 °C で保存した.

(2) RNA の摘出

脳からの RNA の抽出には TRIzol® Reagent を使用した. 凍結した脳の半脳の入ったチューブに 0.5 ml の TRIzol を加え, すり合わせ式ホモジナイザー (オーバーヘッドスターラー No.903475, WHEATO, USA) でホモジナイズした. これにクロロホルム 0.1 ml を加え, よく振り混ぜ 4 °C で 3 分間放置した後, 微量高速冷却遠心機 (MX-300, TOMY) で遠心した (12000 G, 15 min, 4 °C), 上清をイソプロピルアルコール 0.25 ml の入ったチューブに移し, 振り混ぜた後, 10 分間室温で放置した. その後, 遠心 (12000 G, 10 min, 4 °C) を行い, 上清を除去, 75 % エタノール 0.5 ml による洗いをし遠心した (7500 G, 5 min, 4 °C). 上清を除去し乾燥させた後 DEPC 水 50 µl に溶かし, 分光光度計 (GeneQuant pro RNA / DNA Calculator 80-2110-98, Amersham, USA) にて吸光度を測定し Total RNA 濃度を求めた.

(3) 1st strand cDNA の合成

1st strand cDNA の合成および PCR には RNA PCR Kit を用いた. Total RNA 0.5 µg に MgCl₂ (25 mM) 2 µl, 10×RNA PCR Buffer 1 µl, dNTP Mixture (10 mM) 1 µl, RNase Inhibitor (40 U/µl) 0.25 µl, Oligo dT-Adaptor Primer (2.5 pmol/µl) 0.5 µl, AMV Reverse Transcriptase XL 0.5 µl に DEPC 水を全量 10 µl になるよう加えよく混和し, マスターサイクラー (サーマルサイクラー Life800, 日本ジェネティクス株式会社, Japan) にセットし, 逆転写反応 (42 °C 1 h, 99 °C 5 min) を行い, 1st strand cDNA を合成した.

(4) PCR

1st strand cDNA の入ったチューブに 5×PCR Buffer 10 μ l, primer (sense, antisense : 20 μ l) 各 0.5 μ l, TaKaRa Ex Taq®HS 0.25 μ l, 滅菌超純水 28.75 μ l を加えよく混ぜ, あらかじめ 94 $^{\circ}$ C に温めておいたマスターサイクラーにて PCR を行った. また内部標準として β -actin についても同じように PCR を行った. なお, サイクル数は増幅した DNA 量がプラトーに達していないことをあらかじめ確認し, 最適な条件で実験を行った. 反応条件とプライマーの配列は以下に示す通りである.

・反応条件

GIRK2: (1 cycle at 94 $^{\circ}$ C for 2 min, 31 cycles at 94 $^{\circ}$ C for 1 min, 58 $^{\circ}$ C for 1 min, 72 $^{\circ}$ C for 2 min, 1 cycle at 72 $^{\circ}$ C for 7 min), primer ; RT-GIRK2-S, RT-GIRK2-AS

β -actin: (1 cycle at 94 $^{\circ}$ C for 2 min, 27 cycles at 94 $^{\circ}$ C for 1 min, 60 $^{\circ}$ C for 1 min, 72 $^{\circ}$ C for 2 min, 1 cycle at 72 $^{\circ}$ C for 7 min), primer ; RT- β -actin-S, RT- β -actin-AS

・電気泳動

得られた PCR 産物のうち 10 μ l に Gel loading solution 2 μ l を加え, 2 %アガロースゲル中で 100 V, 40 分間電気泳動した (Mupid-2, コスモバイオ, Japan). 電気泳動終了後, エチジウムブロマイドでアガロースゲルを 30 分間染色し, トランスイルミネーター (CI-310B, バイオクラフト) で UV 照射してバンドを検出した. 同時に, ゲル撮影装置 (DS-430, バイオクラフト) にて UV 照射したアガロースゲルのデジタル画像を取得した.

(5) データ解析

取得したデジタル画像から Adobe Photoshop 5.0 Limited Edition (アドビシステムズ) と Scion Image beta 4.0.2 (Scion Corporation, USA) を用いて各バンドの面積を数値化した. ゲル間の補正をするために, マスマーカーでもある Smart Ladder の DNA 量から各バンドの DNA 量を算出し, さらにその DNA 量を各サンプルの β -actin の DNA 量で割り, 補正したものを各サンプルの mRNA レベルとした.

第3および4章

1. 免疫組織染色法

(1) 凍結切片の作製法

マウスをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) で麻酔後、開腹し、すばやく心臓を露出させ、左心突よりゾンデを挿入、上大静脈を介して、0.1 M phosphate buffer, 次いで4% パラホルムアルデヒドで灌流し、全身を固定した。灌流固定後、断頭し脳を取り出し、4% パラホルムアルデヒドで一晩浸漬固定し、30% スクロースに1日間浸した。スクロース置換後、ブレインスライサーを用いて腹側被蓋野および青斑核を含む領域を冠状で切り分け、O.C.T compound に脳を包埋し、-80 °Cで凍結させ、クリオスタット (LEICA CM3050) を用いて 20 μm の切片を作製し、TBS の入った蓋付バイアル瓶 (NICHIDEN-RIKA GLASS SV-20)に入れた。

(2) 免疫組織化学染色

蓋付バイアル瓶に入ったスライス切片を、tris buffered saline (TBS) で10分間ずつ2回洗浄後、0.1% TritonX-100 in TBS (TBST) で10分間インキュベートした。4% 正常ヤギ血清で1時間インキュベートした。その後、一次抗体 (rabbit anti-Kir 3.2, Alomone labs; 1:400) および (guinea-pig polyclonal IgG anti-TH, Synaptic System, 1:1500) を加え、室温で2時間インキュベートした後、4 °Cで一日間反応させた。TBS で10分間ずつ5回洗浄後、二次抗体 (488 goat anti-rabbit, molecular probes; 1:200) および (546 goat anti-guinea pig, molecular probes; 1:200) で2時間インキュベートし、次にTBS で10分間ずつ5回洗浄した。脳スライス切片は、ゼラチンコートしたスライドガラスに載せ、VECTASHIELD (VECTOR LABORATORIES, California, USA) を適量添加し、カバーガラスを載せ封入した。染色後のスライス切片は蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, Keyence, Japan) で観察した。

2. 行動実験

(1) 強制水泳試験

透明の亚克力製シリンダー (直径 20 cm, 高さ 40 cm) を2個用意し、間に木製の仕切り板を立てた。亚克力シリンダーには底から 15 cm の高さまで水を張り、オートヒーターで水温を 25 ±1 °Cに保った。各シリンダーに1匹ずつマウスを入れ、6分間強制水泳させた。水泳中は、動物への影響を考慮し、実験者は部屋の外に移動し、ビデオカメラでの録画を行った。水泳後、マウスをシリンダーから取り出し、乾いたタオルで拭き、新しいケージに移し約 20 分間乾燥させた後、ホームケージに戻した。シリンダーの水は、2回使用した後に新しい水と交換したが、脱糞の程度によっては1回で交換した。6分間の試験時間のうち、最初の2分間を馴化期間とし、残りの4分間における行動を記録した。マウスが水面上に頭だけを出し手足を動かすことなく浮いている状態を無動とみなし、目視

にてこの無動時間 (immobility time) をストップウォッチで測定した。また、測定のバイアスを避けるためブラインド下で測定を行った。なお、強制水泳試験は明期である 8:00~20:00 の間に行った。

(2) オープンフィールド試験

実験は静寂で、40 W の電球を天井に 3 個照射した状態の薄暗い部屋で行った。行動解析装置に内蔵されたソフトウェアによって、行動実験装置内の照度に偏りが生じていないことを確認した。実験動物は、試験環境に馴化させる目的で少なくとも試験開始の 1 時間前までには飼育室から実験室へ移動させた。また、測定の間、実験者は部屋の外に移動した。オープンフィールド (500 mm x 500 mm x 500mm) の中央部分にマウスを置き、ビデオトラッキングシステムにより 6 分間の歩行距離を測定した。なお、オープンフィールド試験は明期である 8:00~20:00 の間に行った。

3. パッチクランプ法

(1) マウス腹側被蓋野ニューロンの急性単離法

実験動物は、遺伝子改変マウス 9-15 日齢を雌雄の区別なく使用した。ペントバルビタール麻酔下に断頭し、すばやく脳を摘出した。マイクロスライサー (DTK-1000N, DOSAKA EM, Kyoto, Japan) を用いて脳幹から厚さ 300 μm の冠状スライス切片を作成し、95 % O_2 / 5 % CO_2 混合ガスで十分バブリングした Krebs 液中に、室温で 50 分間静置した。その後、Krebs 液に溶解した 31 $^{\circ}\text{C}$ の pronase 溶液 (1 mg/6 ml) で 30-60 分間、次いで同様に thermolysin 溶液 (1 mg / 6 ml) で、10 分間酵素処理を行った。酵素処理後、およそ 60 分間室温で Krebs 液中に静置した後、実体顕微鏡 (MS-5, Leica, Wetzlar, Germany) 下に、メス (MICRO FEATHER, FEATHER, Osaka, Japan) を用いて脳幹スライス切片より腹側被蓋野領域、あるいは青斑核領域を切り出した。100 % O_2 ガスで十分にバブリングした HEPES 緩衝細胞外液で満たした 35 mm の培養皿 (Priamaria 3801, Becton Dicknson, USA) に切り出した腹側被蓋野領域を移し、倒立顕微鏡 (DM-IL, Leica, Wetzlar, Germany) 下に先端径 50~500 μm のガラスピペットを用いて、器械的に分散して単離ニューロンを得た。また、ニスタチン穿孔パッチクランプ法のボルテージクランプ条件下で過分極性ステップパルス (-140 mV ~ -60 mV) を与えた時に観測される過分極活性化電流 (I_h) を指標に、腹側被蓋野の DA ニューロンを同定した。

<細胞外液>

脳スライス切片の作成および酵素処理には、以下のイオン組成 (in mM) の Krebs 液を用いた.

・脳スライス切片の作成

Sucrose	248	mM
KCl	5	mM
MgSO ₄	1	mM
CaCl ₂	2	mM
NaHCO ₃	24	mM
Glucose	10	mM
KH ₂ PO ₄	1.2	mM

・酵素処理

NaCl	124	mM
KCl	5	mM
MgCl ₂	1	mM
CaCl ₂	2	mM
NaHCO ₃	24	mM
Glucose	10	mM
KH ₂ PO ₄	1.2	mM

pH は 95 % O₂ / 5 % CO₂ 混合ガスでバブリングし, 7.4 に調整した.

ニューロンの単離およびパッチクランプ実験には、以下のイオン組成 (in mM) の HEPES 緩衝細胞外液を用いた.

・HEPES 緩衝細胞外液

NaCl	150	mM
KCl	5	mM
MgCl ₂	1.2	mM
CaCl ₂	2.5	mM
Glucose	11.5	mM
HEPES	10	mM

pH は 1 N NaOH により 7.4 に調節した.

急性単離ニューロンを用いるパッチクランプ法

<記録用ガラス電極>

外径 1.5 mm, 長さ 90 mm の硬質ガラス管 (G1.5, Narishige, Tokyo, Japan) を使用した. パッチ電極作製機 (PP-83, Narishige, Tokyo, Japan) を用いて, 先端内径が約 1 μm のパッチ電極を作製した. 細胞内液を充填したときの直流抵抗が 5~8 $\text{M}\Omega$ のものを実験に使用した.

<細胞外液>

GIRK チャネル活性化電流の記録には, 20 mM K^+ を含む以下の組成の細胞外液を用いた.

・ 20 mM K^+ 細胞外液

NaCl	135	mM
KCl	20	mM
MgSO ₄	1	mM
CaCl ₂	2	mM
Glucose	10	mM
HEPES	10	mM

pH は 1N NaOH により 7.4 に調整した.

<細胞内液>

ニスタチン保存溶液

ニスタチン 30 mg をメタノール 3 ml に加え, 超音波洗浄機 (UT-204, SHARP, Japan) にて分散させた. 引き続きスターラーで攪拌し, pH メーターで pH を測定しながらニスタチンが溶解して黄色に着色した透明な溶液となるまで 1 N HCl を適量加えた. ニスタチンの溶解と同時に 1 N KOH を直ちに加えて pH を 7.2 とした. この溶液を 1 ml ずつエッペンドルフチューブに分注し, -20 $^{\circ}\text{C}$ にて保存した. 保存液は 7 日以内に使用した.

電極内液は以下の組成の液を用いた.

・ ニスタチン穿孔パッチクランプ用電極内液

KCl	75	mM
K-gluconate	60	mM
HEPES	10	mM

(2) 記録方法

位相差顕微鏡 (TE300, Nikon, Tokyo, Japan) で観察しながら, 三次元マイクロマニピュレーター (NMN-21, Narishige, Tokyo, Japan) を用いて, 電極先端を単離ニューロンの表面に軽く接触させ, 電極内を弱く陰圧にして, ギガオームシールを形成した. シール形成後, 保持電位 -80 mV にて 30 秒間~10 分間放置すると, ニスタチンがパッチ膜に 1 価のイオンに選択的な小孔を形成し, $30\text{ msec} \cdot 50\text{ mV}$ の脱電極パルスに対して, 安定した Na^+ 電流を惹起した. この時に Na^+ 電流は, 典型的な速い立ち上がりと速くかつ指数関数的な減衰過程を有し, 膜電位の空間固定も良好であった. 細胞外に 20 mM K^+ 細胞外液をかん流し, 保持電位を -80 mV に固定し SN (signal/noise ratio) 比の良い電流を記録した. 膜電流は, パッチクランプ増幅器 (Axopatch 200B, Axon Instruments, Burlingame, CA, USA) により増幅後, on line にてサンプリング周波数 10 kHz でデジタル化 (Digidata 1550B, Axon Instruments, Burlingame, CA, USA) した後, データ取得ソフト pCLAMP 10.7 (Axon Instruments, Burlingame, CA, USA) にてパーソナルコンピュータに記録した.

(3) 薬物投与

薬物は本節第 2 項に示す 20 mM K^+ 細胞外液に溶解し, Y-チューブ法により 20 msec 以内に急速投与した. Y-チューブの一端は薬液リザーバーに浸し, もう一端を電磁弁, 減圧ピンを介して吸引ポンプに接続した. 電磁弁を短時間開くことで Y-チューブ内に薬液を充填し, 電磁弁が閉じた後, 薬液の液面と Y-チューブ先端との静水圧の差により, 内径 $30\text{ }\mu\text{m}$ の Y-チューブ先端からパッチ電極に向けて薬液を勢い良く噴出させた. Y-チューブの先端は, 三次元マイクロマニピュレーター (MN-153, Narishige, Tokyo, Japan) を用いてパッチ電極先端より水平方向に約 $200\text{ }\mu\text{m}$, ディッシュ面より約 $50\text{ }\mu\text{m}$ の位置にセットし, Y-チューブ先端からの水流の中心にパッチ電極がくるように調整した.

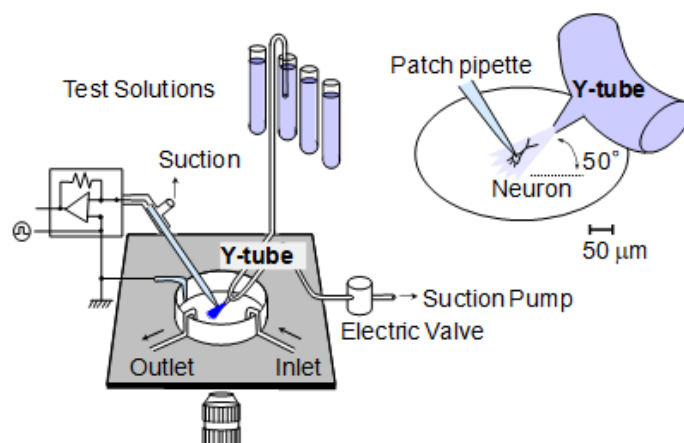


Fig. 22 Schematic drawing of patch clamp recording and the fast drug a application with the "Y-tube".

データ解析

得られた膜電流および膜電位変化は、データ解析ソフト CLAMPEX 10.7 (Axon Instrument, USA) を用いて解析した。

4. ドパミン量の測定

マウスをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) で麻酔後、脳を素早く摘出し、氷上、顕微鏡下で前頭皮質、側坐核 core, shell, 線条体に分画した。組織はドパミンの分解を防ぐため、EDTA (1 mM) sodium metabisulfite (4 mM) 下でホモジナイズした。ドパミン量は ELISA キット (Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany) を用いて測定した。

5. 統計解析

得られた結果は、Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) を用いて解析した。統計データは平均値 ± 標準誤差として表した。有意差の検定は、3 群以上の場合には SPSS ver.13.0 (SPSS Japan, Tokyo) 一元配置の分散分析 (One way analysis of variance : one-way ANOVA) を行い、次いで Tukey-Kramer's test を行った。2 群の場合には Student's t-test を行った。P<0.05 で有意差ありとした。

謝 辞

平成 25 年 9 月以降，本研究を継続することをお認め頂き，本研究および本稿作成に当たり，多くの有益な御指導と御助言を賜りました，熊本大学大学院生命科学研究部環境分子保健学分野 三隅 将吾 教授に厚く感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて戴き，終始御指導と御鞭撻を賜り，かつ本稿作成にあたり多大な御高閲賜りました，熊本大学大学院生命科学研究部環境分子保健学分野 高濱 和夫 教授（平成 25 年 4 月から同大学名誉教授、熊本保健科学大学保健科学部教授および平成 27 年 4 月から熊本大学産学連携研究員）に心から厚く感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり，有益なる御助言と御校閲を賜りました，熊本大学大学院生命科学研究部遺伝子機能応用学分野 甲斐 広文 教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の審査にあたり，有益なる御助言と御校閲を賜りました，熊本大学大学院生命科学研究部薬物活性学分野 香月 博志 教授ならびに同研究部薬学生化学分野 杉本 幸彦 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究にあたり，多大なる御指導，御鞭撻を賜りました熊本大学生命資源研究・支援センター疾患モデル分野 山村 研一 教授（平成 26 年 4 月から同センター，山村プロジェクト研究室 教授）に深甚なる感謝の意を表します。

本研究にあたり，多くの有益な御指導と御鞭撻を賜り，かつ本稿作成にあたり有益な御教示，御校閲を戴きました熊本大学生命資源研究・支援センター疾患モデル分野 荒木 喜美 准教授（平成 26 年 5 月から同分野教授）に深く感謝致します。

本研究にあたり，貴重な遺伝子改変マウス（B6.Cg-Tg(Nes-cre)1Nogu）を供与して頂きました，公益財団法人神奈川科学技術アカデミー 野口 茂 博士ならびに新潟大・脳研究所生命科学リソース研究センター 笹岡 俊邦 教授に深く感謝致します。

本研究にあたり，多くの御指導と御助言を賜りました，熊本保健科学大学保健科学部 土井 篤 教授ならびに同分野 申 敏哲 准教授に深く感謝致します。

本研究にあたり，多くの御指導と御助言を賜りました，熊本大学大学院生命科学研究部環境分子保健学分野 白崎 哲哉 准教授（平成 25 年 4 月から九州保健福祉大学薬学部教授）ならびに同分野 副田 二三夫 助教（平成 28 年 4 月から第一薬科大学薬学部准教授）

に深く感謝致します。

本研究にあたり、その礎を築いて戴き、さらに多くの面で御指導と御助言を賜りました、アステラス製薬株式会社 本田 宗吉 博士に深く感謝致します。

本研究ならびに大学生活に際し、研究室配属時より多くの御指導、御鞭撻を戴きました熊本大学大学院薬学教育部博士課程 川浦 一晃 氏（現、大正製薬株式会社）、同大学院薬学教育部博士課程 河原 遼 氏（現、株式会社大塚製薬工場）、同大学院薬学教育部博士前期課程 野口 哲郎 氏（現、株式会社新日本科学）、同大学院薬学教育部博士前期課程 浜崎 亮太 氏（現、小野薬品工業株式会社）に心より感謝致します。

本研究にあたり、叱咤、激励を戴きました先輩諸氏、ならびに共に勉学に励んだ同級生、後輩諸子に心より感謝致します。特に、熊本大学大学院生命科学研究部環境分子保健学分野 野 岸本 直樹 助教ならびに熊本大学薬学部環境分子保健学分野の諸氏に心より感謝の意を表します。

また、博士後期課程の研究生活に際し、日本学術振興会による特別研究員（DC2）への採用および日本薬学会長井記念薬学研究奨励金からご支援を頂戴しました。厚く感謝申し上げます。

なお、熊本大学薬学部教員の皆様ならびに実験動物の管理、飼育をして戴いた 熊本大学薬学部動物舎管理委員の皆様心より感謝致します。

そして、本研究を遂行するにあたり、実験に供され犠牲となった動物に心より感謝するとともに安らかなる御冥福をお祈り致します。

最後に、私をここまで支えてくれた友人に、そしてここまで私を育て見守ってくれた両親をはじめとする親族の皆に心より感謝致します。

2018年3月 本多 幾多郎

参考文献

1. 患者調査, 厚生労働省ホームページ
< http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/10-20-kekka_gaiyou.html >
2. Gartlehner G, Hansen RA, Morgan LC, Thaler K, Lux LJ, Van Noord M, Mager U, Gaynes BN, Thieda P, Strobelberger M, Lloyd S, Reichenpfader U, Lohr KN., Second-Generation Antidepressants in the Pharmacologic Treatment of Adult Depression: An Update of the 2007 Comparative Effectiveness Review., Agency for Healthcare Research and Quality (US), Report No.: 12-EHC012-EF (2011).
3. Goodman WK, Murphy TK, Storch EA., Risk of adverse behavioral effects with pediatric use of antidepressants., *Psychopharmacology (Berl)*, 191, 87-96 (2007) .
4. Sasaki T, Hashimoto K, Tachibana M, Kurata T, Okawada K, Ishikawa M, Kimura H, Komatsu H, Ishikawa M, Hasegawa T, Shiina A, Hashimoto T, Kanahara N, Shiraishi T, Iyo M. Tipepidine in children with attention deficit/hyperactivity disorder: a 4-week, open-label, preliminary study. *Neuropsychiatr Dis Treat.*, 10:147-151 (2014).
5. Tomoda A, Takiguchi S, Fujisawa TX, Yatsuga C, Kumazaki H, Fujioka T, Suzuki H, Matsuzaki H, Kosaka H, Tanaka S. Effectiveness of oral tipepidine administration for children with attention deficit/hyperactivity disorder: A 4-week, open-label clinical study. *Psychiatry Clin Neurosci.*, 69(10):658-659 (2015).
6. Sasaki T, Hashimoto K, Tachibana M, Kurata T, Kimura H, Komatsu H, Ishikawa M, Hasegawa T, Shiina A, Hashimoto T, Kanahara N, Shiraishi T, Iyo M. Tipepidine in adolescent patients with depression: a 4 week, open-label, preliminary study. *Neuropsychiatr., Dis Treat.*, 10:719-722 (2014).
7. Shirayama Y, Suzuki M, Takahashi M, Sato K, Hashimoto K. Effects of add-on tipepidine on treatment-resistant depression: an open-label pilot trial. *Acta Neuropsychiatr.*, 28(1):51-54 (2016).
8. Ishibashi H., Kuwano K., Takahama K., Inhibition of the 5-HT(1A) receptor-mediated inwardly rectifying K(+) current by dextromethorphan in rat dorsal raphe neurones. *Neuropharmacology*, 39:2302-2308 (2000).
9. Takahama K., Shirasaki T., Soeda F., Central mechanisms III: neuronal mechanisms of action of centrally acting antitussives using electrophysiological and neurochemical study approaches. K.F. Chung, J. Widdicombe, Editors Handbook of experimental pharmacology; *pharmacology and therapeutics of cough*, 187:219-240 (2009).
10. Hamasaki R, Shirasaki T, Soeda F, Takahama K. Tipepidine activates VTA

dopamine neuron via inhibiting dopamine D₂ receptor-mediated inward rectifying K⁺ current. *Neuroscience*, **252**:24-34 (2013).

11. Bayliss D.A., Li Y.W., Talley E.M., Effects of serotonin on caudal raphe neurons: inhibition of N- and P/Q-type calcium channels and the afterhyperpolarization. *J. Neurophysiol.*, **77**:1362-1374 (1997).
12. Arima J., Kubo C., Ishibashi H., Akaike N., alpha2-Adrenoceptor-mediated potassium currents in acutely dissociated rat locus coeruleus neurones. *J. Physiol.*, **508**:57-66 (1998).
13. Lledo P.M., Homburger V., Bockaert J., Vincent J.D., Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron*, **8**:455-463 (1992).
14. Pfaffinger PJ, Martin JM, Hunter DD, Nathanson NM, Hille B. GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature*, **317**(6037):536-538 (1985).
15. Jan LY, Jan YN. Heartfelt crosstalk: desensitization of the GIRK current. *Nat Cell Biol.*, **2**(9):E165-167 (2000).
16. Miwa A, Ui M, Kawai N. G protein is coupled to presynaptic glutamate and GABA receptors in lobster neuromuscular synapse. *J Neurophysiol.*, **63**(1):173-180 (1990)
17. Saugstad JA, Segerson TP, Westbrook GL. Metabotropic glutamate receptors activate G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci.*, **16**(19):5979-5985 (1996).
18. Kobayashi T, Ikeda K, Ichikawa T, Togashi S, Kumanishi T. Effects of sigma ligands on the cloned mu-, delta- and kappa-opioid receptors co-expressed with G-protein-activated K⁺ (GIRK) channel in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol.*, **119**(1):73-80 (1996).
19. Karschin C, Dissmann E, Stühmer W, Karschin A. IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci.*, **16**(11):3559-3570 (1996).
20. Signorini S, Liao YJ, Duncan SA, Jan LY, Stoffel M. Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**(3):923-927 (1997).
21. 井上雅子, 多彩な薬理活性をもつ GIRK チャネル抑制作用薬の脳内モノアミン増加作用, 熊本大学大学院修士論文 (2009).
22. Hamao K, Kawaura K, Soeda F, Hamasaki R, Shirasaki T, Takahama K. Tipepidine increases dopamine level in the nucleus accumbens without methamphetamine-like behavioral sensitization. *Behav Brain Res.*, **284**:118-124 (2015).

23. Takahama K. Multiple pharmacological actions of centrally acting antitussives--Do they target G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels? *J Pharmacol Sci.*, **120**(3):146-51 (2012).
24. Yamamoto G, Soeda F, Shirasaki T, Takahama K. Ameliorating effects of cloperastine on dysfunction of the urinary bladder caused by cerebral infarction in conscious rats. *Can J Physiol Pharmacol.*, **87**(11):893-899 (2009).
25. Soeda F, Hirakawa E., Inoue M., Shirasaki T., Takahama K., Cloperastine rescues impairment of passive avoidance response in mice prenatally exposed to diethylstilbestrol. *Environ.Toxicol.*, **29**:216-225 (2014).
26. 藤枝 美子, 薬物誘発性多動マウスにおける中枢性鎮咳薬の作用に関する研究, 熊本大学大学院修士論文 (2006).
27. Soeda F, Fujieda Y, Kinoshita M, Shirasaki T, Takahama K. Centrally acting non-narcotic antitussives prevent hyperactivity in mice: Involvement of GIRK channels. *Pharmacol Biochem Behav.*, **144**:26-32 (2016).
28. 緒方 雪乃, 治療抵抗性うつ病モデル動物における既存薬の新規抗うつ様作用に関する研究, 熊本大学大学院修士論文 (2008).
29. 川浦 一晃, GIRK チャネル抑制作用をもつチペピジンの新規抗うつ様作用の発見とその作用の薬理的解析, 熊本大学大学院博士論文 (2012).
30. 川上 恵子, GIRK チャネル抑制作用薬チペピジンの新規抗パーキンソン病作用-モデル動物での検討-, 熊本大学大学院修士論文 (2010).
31. Honda S, Kawaura K, Soeda F, Shirasaki T, Takahama K. The potent inhibitory effect of tipegidine on marble-burying behavior in mice. *Behav Brain Res.*, **216**(1):308-312 (2011).
32. 三木 理沙, Tipegidine の抗統合失調症様作用の発見とその作用の解析, 熊本大学大学院修士論文 (2012).
33. 浦島 優里, Tipegidine の鎮痛様作用に関する薬理的解析, 熊本大学卒業論文 (2014).
34. 岩下 知子, GIRK チャネル抑制作用をもつ薬物の新規鎮痒様作用に関する薬理的解析, 熊本大学卒業論文 (2014).
35. 河原 遼, GIRK チャネルを標的にした次世代型難治性脳疾患治療薬 (抗うつ薬とアルツハイマー治療薬) の開発に関する研究, 熊本大学大学院博士論文 (2016).
36. Kobayashi T, Ikeda K, Kumanishi T., Inhibition by various antipsychotic drugs of the G-protein-activated inwardly rectifying K(+) (GIRK) channels expressed in xenopus oocytes. *British Journal of Pharmacology*, **129**:1716 -1722 (2000).
37. Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K., Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by fluoxetine (Prozac). *British Journal of Pharmacology*,

- 138:1119-1128 (2003).
38. Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K., Inhibition of G Protein-Activated Inwardly Rectifying K⁺ Channels by Various Antidepressant Drugs. *Neuropsychopharmacology*, **29**:1841-1851 (2004).
 39. Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K., Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by ifenprodil. *Neuropsychopharmacology*, **31**:516-524 (2006).
 40. Kobayashi T, Hirai H, Iino M, Fuse I, Mitsumura K, Washiyama K, Kasai S, Ikeda K., Inhibitory effects of the antiepileptic drug ethosuximide on G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Neuropharmacology*, **56**:499-506 (2009).
 41. Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K., Inhibition of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by the selective norepinephrine reuptake inhibitors atomoxetine and reboxetine. *Neuropsychopharmacology*, **35**:1560-1569 (2010).
 42. Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K., Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by different classes of antidepressants. *PLoS One*, **6**(12), (2011).
 43. Kuzhikandathil EV1, Oxford GS., Classic D1 dopamine receptor antagonist R-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH23390) directly inhibits G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels. *Mol Pharmacol.*, **62**(1):119-126 (2002).
 44. Signorini S., Liao YJ., Duncan SA., Jan LY., Stoffel M., Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**:923-927 (1997).
 45. Pravetoni M., Wickman K., Behavioral characterization of mice lacking GIRK/Kir3 channel subunits. *Genes Brain Behav.*, **7**(5):523-31 (2008).
 46. Frieder Schwenk., Udo Baron., Klaus Rajewsky., A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP⁻flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.*, **23**:5080-5081 (1995).
 47. Jianjun Wei., Marion E. Hodes., Roberto Piva., Yue Feng., Yi Wang., Bernardino Ghetti., Stephen R. Dlouhy., Characterization of Murine GirK2 Transcript Isoforms: Structure and Differential Expression. *GENOMICS*, **51**:379-390 (1998).
 48. Florian Lesage, Fabrice Duprat, Michel Fink, Eric Guillemare, Thierry Coppola, Michel Lazdunski, Jean-Philippe Hugnot., Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K⁺ channels in the brain. *FEBS Letters*, **353**:37-42 (1994).
 49. M. Stoffel, Y. Tokuyama, J.B. Trabb, M.S. German, M.L. Tsarr, L.Y. Jan, K.S. Polonsky, G.I. Bell., Cloning of Rat KATP-2 Channel and Decreased Expression in

- Pancreatic Islets of Male Zucker Diabetic Fatty Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **212**(3):894-899 (1995).
50. Adra C. N., Boer P. H., McBurney M. W., Cloning and expression of the mouse pgk-1 gene and the nucleotide sequence of its promoter. *Gene*, **60**:65-74 (1987).
 51. Paul Hasty., Jaime Rivera- Perez., Allan Bradley., The Length of Homology Required for Gene Targeting in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol.*, **11**:5586-5591 (1991).
 52. Paul Hasty., Jaime Rivera- Perez., Christine Chang., Allan Bradley., Target Frequency and Integration Pattern for Insertion and Replacement Vectors in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol.*, **11**:4509-4517 (1991).
 53. Urnov, F. D, Rebar, E. J, Holmes, M. C, Zhang, H. S, & Gregory, P. D., Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.*, **11**:636-646 (2010).
 54. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, **15**,339(6121):823-826 (2013).
 55. Carroll, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, **188**:773-782 (2011).
 56. Bogdanove, A. J & Voytas, D. F. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, **333**:1843-1846 (2011).
 57. Christian, M, Cermak, T, Doyle, E. L, Schmidt, C, Zhang, F, Hummel, A, Bogdanove, A. J, & Voytas, D. F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, **186**:757-761 (2010).
 58. Miller, J. C, Tan, S, Qiao, G, Barlow, K. A, Wang, J, Xia, D. F, Meng, X, Paschon, D. E, Leung, E, Hinkley, S. J, Dulay, G. P, Hua, K. L, Ankoudinova, I, Cost, G. J, Urnov, F. D, Zhang, H. S, Holmes, M. C, Zhang, L, Gregory, P. D, & Rebar, E. J. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol.*, **29**:143-148 (2011).
 59. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D. et al.: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339**:819-823 (2013).
 60. Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S. et al.: One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, **153**:910-918 (2013).
 61. Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R., One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, **154**:1370-1379 (2013).
 62. Llamosas N, Bruzos-Cidón C, Rodríguez JJ, Ugedo L, Torrecilla M. Deletion of

- GIRK2 Subunit of GIRK Channels Alters the 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Signaling and Results in a Depression-Resistant Behavior. *Int J Neuropsychopharmacol.*, **18**(11):pyv051 (2015).
63. Tanaka K, Furuyashiki T, Kitaoka S, Senzai Y, Imoto Y, Segi-Nishida E, Deguchi Y, Breyer RM, Breyer MD, Narumiya S. Prostaglandin E₂-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *J Neurosci.*, **32**(12):4319-29 (2012).
 64. Torrecilla M, Fernández-Aedo I, Arrue A, Zumarraga M, Ugedo L. Role of GIRK channels on the noradrenergic transmission in vivo: an electrophysiological and neurochemical study on GIRK2 mutant mice. *Int J Neuropsychopharmacol.*, **16**(5):1093-104 (2013).
 65. Workman ER, Haddick PC, Bush K, Dilly GA, Niere F, Zemelman BV, Raab-Graham KF. Rapid antidepressants stimulate the decoupling of GABA(B) receptors from GIRK/Kir3 channels through increased protein stability of 14-3-3 η . *Mol Psychiatry.*, **20**(3):298-310 (2015).
 66. 浜崎 亮太, GIRK チャンネル抑制作用薬物および関連薬物の腹側被蓋野ニューロンにおける作用の微細解析, 熊本大学大学院修士論文 (2014)
 67. Bäckman CM, Malik N, Zhang Y, Shan L, Grinberg A, Hoffer BJ, Westphal H, Tomac AC., Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *Genesis*, **44**(8):383-390 (2006).
 68. Adell A, Artigas F. The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev.*, **28**(4):415-431 (2004).
 69. Cruz HG, Ivanova T, Lunn ML, Stoffel M, Slesinger PA, Lüscher C. Bi-directional effects of GABA(B) receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. *Nat Neurosci.*, **7**(2):153-159 (2004).
 70. Neuhoff H, Neu A, Liss B, Roeper J. I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci.*, **22**(4):1290-302 (2002).
 71. Lammel S., Hetzel A, Häckel O., Jones I., Liss B., Roeper J., Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron*, **57**: 760-773 (2008).
 72. Kawaura K, Ogata Y, Honda S, Soeda F, Shirasaki T, Takahama K. Tipepidine, a non-narcotic antitussive, exerts an antidepressant-like effect in the forced swimming test in adrenocorticotrophic hormone-treated rats. *Behav Brain Res.*,

- 302:269-278 (2016).
73. Kawaura K, Miki R, Urashima Y, Kawahara R, Soeda F, Shirasaki T, Takahama K. Pharmacological mechanisms of antidepressant-like effect of tipepidine in the forced swimming test. *Behav Brain Res.*, **226**(2):381-385 (2012).
 74. Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai HC, Finkelstein J, Kim SY, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS, Gunaydin LA, Witten IB, Deisseroth K. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*, **493**(7433):537-541 (2013).
 75. Christoffel DJ, Nectow AR, Ekstrand M, Domingos A, Mazei-Robison MS, Mouzon E, Lobo MK, Neve RL, Friedman JM, Russo SJ, Deisseroth K, Nestler EJ, Han MH. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature*, **493**(7433):532-536 (2013).
 76. Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, Konno K, Yamasaki M, Yanagawa Y, Minami M, Watanabe M. Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *J Neurosci.*, **32**(50):18035-18046 (2012).
 77. Deyama S, Katayama T, Ohno A, Nakagawa T, Kaneko S, Yamaguchi T, Yoshioka M, Minami M. Activation of the beta-adrenoceptor-protein kinase A signaling pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain in rats. *J Neurosci.*, **28**(31):7728-7736 (2008).
 78. Pezük P, Göz D, Aksoy A, Canbeyli R. BNST lesions aggravate behavioral despair but do not impair navigational learning in rats. *Brain Res Bull.*, **69**(4):416-421 (2006).
 79. Schulz D, Canbeyli RS. Lesion of the bed nucleus of the stria terminalis enhances learned despair. *Brain Res Bull.*, **52**(2):83-87 (2000).
 80. 島 絵里子, Típepidine の抗うつ様作用に関する薬理学的・薬物動態学的解析, 熊本大学大学院修士論文, (2011).
 81. Kotecki L, Hearing M, McCall NM, Marron Fernandez de Velasco E, Pravetoni M, Arora D, Victoria NC, Munoz MB, Xia Z, Slesinger PA, Weaver CD, Wickman K. GIRK Channels Modulate Opioid-Induced Motor Activity in a Cell Type- and Subunit-Dependent Manner. *J Neurosci.*, **35**(18):7131-7142 (2015).
 82. McCall NM, Kotecki L, Dominguez-Lopez S, Marron Fernandez de Velasco E, Carlblom N, Sharpe AL, Beckstead MJ, Wickman K. Selective Ablation of GIRK Channels in Dopamine Neurons Alters Behavioral Effects of Cocaine in Mice. *Neuropsychopharmacology*, **42**(3):707-715 (2017).
 83. Heurteaux C, Lucas G, Guy N, El Yacoubi M, Thümmeler S, Peng XD, Noble F,

- Blondeau N, Widmann C, Borsotto M, Gobbi G, Vaugeois JM, Debonnel G, Lazdunski M. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci.*, **9**(9):1134-1141 (2006).
84. 向井大貴, 中枢性鎮咳薬の GIRK チャンネルに対する作用選択性の電気生理学的解析, 熊本大学大学院修士論文, (2011).
85. Miller G., Is Pharma Running Out of Brainy Ideas? *Science*, **329**:502-504 (2010).
86. Alison A., Novartis to shut brain research facility. *Nature*, **480**:161–162 (2011).
87. Lisanby S.H., Morales O., Payne N., Kwon E., Fitzsimons L., Luber B., Nobler M.S., Sackeim H.A., New developments in electroconvulsive therapy and magnetic seizure therapy. *CNS Spectr.*, **8**: 529-536 (2003).
88. Segovia G., Del Arco A., De Blas M., Garrido P., Mora F., Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *J. Neural. Transm.*, **117**:1123-1130 (2010).
89. Hughes R.N., Otto M.T., Anxiolytic effects of environmental enrichment attenuate sex-related anxiogenic effects of scopolamine in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **40**:252-259 (2013).
90. Hendriksen H., Meulendijks D., Douma T.N., Bink D.I., Breuer M.E., Westphal K.G., Olivier B., Oosting R.S., Environmental enrichment has antidepressant-like action without improving learning and memory deficits in olfactory bulbectomized rats. *Neuropharmacology*, **6**:270-277 (2012).
91. Jankowsky J.L., Melnikova T., Fadale D.J., Xu G.M., Slunt H.H., Gonzales V., Younkin L.H., Younkin S.G., Borchelt D.R., Savonenko A.V., Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, **25**:5217-5224 (2005).
92. Lazarov O., Robinson J., Tang Y.P., Hairston I.S., Korade-Mirnic Z., Lee V.M., Hersh L.B., Sapolsky R.M., Mirnic K., Sisodia S.S., Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, **120**:701-713 (2005).
93. Dowie M.J., Bradshaw H.B., Howard M.L., Nicholson L.F., Faull .RL., Hannan A.J., Glass M., Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience*, **163**: 456-465 (2009).
94. Bewernick B.H., Hurlemann R., Matusch A., Kayser S., Grubert C., Hadrysiewicz B., Axmacher N., Lemke M., Cooper-Mahkorn D., Cohen M.X., Brockmann H., Lenartz D., Sturm V., Schlaepfer T.E., Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression. *Biol.*

- Psychiatry*, **67**:110-116 (2010).
95. Denys D, Mantione M, Figeo M, van den Munckhof P, Koerselman F, Westenberg H, Bosch A, Schuurman R. Deep brain stimulation of the nucleus accumbens for treatment-refractory obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. **67**(10): 1061-1068, (2010).
 96. 加瀬 佳年, 鎮咳反射の薬理, **325**, 65-71(1960).
 97. Morgan AD, Carroll ME, Loth AK, Stoffel M, Wickman K. Decreased cocaine self-administration in Kir3 potassium channel subunit knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, **28**(5):932-938 (2003).
 98. 高野 賢児, 薬物依存のメカニズムと治療薬の可能性, *J. Neuropsychopharmacol.*, vol.31, No.5/6 (2011).
 99. Lazary J, Juhasz G, Anderson IM, Jacob CP, Nguyen TT, Lesch KP, Reif A, Deakin JF, Bagdy G. Epistatic interaction of CREB1 and KCNJ6 on rumination and negative emotionality. *Eur Neuropsychopharmacol.*, **21**(1): 63-70 (2010).
 100. Bagdy G, Juhasz G, Gonda X. A new clinical evidence-based gene-environment interaction model of depression. *Neuropsychopharmacol Hung.*, **14**(4):213-20 (2012).
 101. Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Ogai Y, Hasegawa J, Sato N, Yamada H, Tanioka F, Sugimura H, Hayashida M, Ikeda K. Association between KCNJ6 (GIRK2) gene polymorphism rs2835859 and post-operative analgesia, pain sensitivity, and nicotine dependence. *J Pharmacol Sci.*, **126**(3):253-263 (2014).
 102. Clarke TK, Laucht M, Ridinger M, Wodarz N, Rietschel M, Maier W, Lathrop M, Lourdasamy A, Zimmermann US, Desrivieres S, Schumann G. KCNJ6 is associated with adult alcohol dependence and involved in gene × early life stress interactions in adolescent alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology*, **36**(6):1142-1148 (2011).
 103. Langford DJ, Paul SM, West CM, Dunn LB, Levine JD, Kober KM, Dodd MJ, Miaskowski C, Aouizerat BE. Variations in potassium channel genes are associated with distinct trajectories of persistent breast pain after breast cancer surgery. *Pain* **156**(3):371-80 (2015).
 104. Bruehl S, Denton JS, Lonergan D, Koran ME, Chont M, Sobey C, Fernando S, Bush WS, Mishra P, Thornton-Wells TA. Associations between KCNJ6 (GIRK2) gene polymorphisms and pain-related phenotypes. *Pain*, **154**(12):2853-2859 (2013).
 105. Cooper A, Grigoryan G, Guy-David L, Tsoory MM, Chen A, Reuveny E. Trisomy of the G protein-coupled K⁺ channel gene, *Kcnj6*, affects reward mechanisms, cognitive functions, and synaptic plasticity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*,

14:109(7):2642-2647 (2012).

106. Sánchez-Rodríguez I, Temprano-Carazo S, Nájera A, Djebari S, Yajeya J, Gruart A, Delgado-García JM, Jiménez-Díaz L, Navarro-López JD. Activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium (Kir3/GirK) channels rescues hippocampal functions in a mouse model of early amyloid- β pathology. *Sci Rep.* **7**(1) (2017).