

岐阜薬科大学博士(薬学)学位論文

認知・感情制御機構におけるジアシルグリセロールキナーゼβ  
(DGKβ)の分子生物学的並びに行動薬理学的研究

掛 札 賢 一

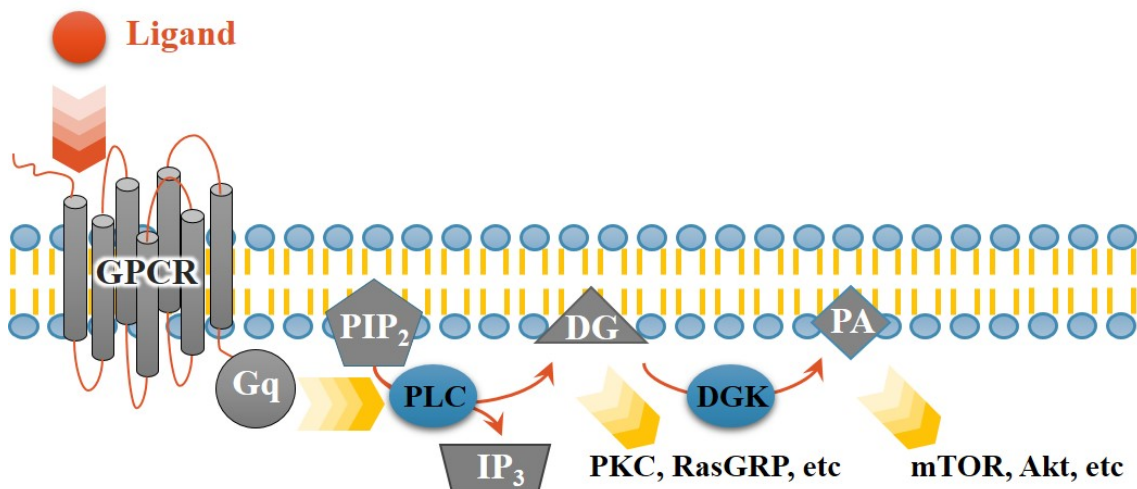
2017年

## 目 次

序論	2 頁
第1章 スパイン形成における DGK $\beta$ の役割	5 頁
1節 諸言	
2節 実験材料および方法	
3節 実験成績	
4節 考察	
第2章 認知機能制御における DGK $\beta$ の役割	33 頁
1節 諸言	
2節 実験材料および方法	
3節 実験成績	
4節 考察	
第3章 感情機能制御における DGK $\beta$ の役割	47 頁
1節 諸言	
2節 実験材料および方法	
3節 実験成績	
4節 考察	
総括および結論	65 頁
謝辞	68 頁
引用文献	69 頁
略語一覧表	75 頁

## 序 論

ジアシルグリセロールキナーゼ (diacylglycerol kinase: DGK)は脂質キナーゼの一種であり、ジアシルグリセロール (diacylglycerol: DG)をリン酸化することでフォスファチジン酸 (phosphatidic acid: PA)を産生する酵素である (Topham and Prescott, 1999)。DG は  $\alpha 1$  アドレナリン受容体や代謝型グルタミン酸受容体 1, 5



**Fig. 1 Gq-protein-coupled receptor downstream signaling.**

GPCR : G-protein-coupled receptor、 Gq : Gq-protein、 PLC : phospholipase C、  
PIP<sub>2</sub> : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate、 IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-trisphosphate、  
DG : diacylglycerol、 DGK : diacylglycerol kinase 、 PA : phosphatidic acid、  
PKC : protein kinase C、 RasGRP : Ras guanyl nucleotide-releasing protein、  
mTOR : mammalian target of rapamycin.

をはじめとした Gq タンパク質共役型の受容体に、リガンドが結合することで活性化されたホスホリパーゼ C (phospholipase C: PLC)によって、ホスファチジルイノシトールニリン酸 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate : PIP<sub>2</sub>)から産生される。Gq タンパク質共役型受容体のセカンドメッセンジャーとしての役割を持ち、プロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) や Ras グアニンヌクレオチド放出タンパク質 (Ras guanyl nucleotide-releasing protein : RasGRP)などの機能を調節する (Topham and Prescott, 2001)。PA も細胞膜の構成脂質としての役割のほかに、哺

乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mammalian target of rapamycin : mTOR)や、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ、Akt の活性やシグナル伝達を制御する機能を持つ (Ghosh et al., 1996) (Fig. 1)。そのため DGK は DG や PA 量を調節することによって、多様な生理作用や複数の病態に関与することが知られている。

近年の一塩基多型解析や遺伝子改変動物解析によって DGK の各種アイソザイムとがんや精神神経疾患、糖尿病などとの関連が示唆されている (Chibalin et al., 2008)。現在、哺乳類においては 10 種の DGK サブタイプ ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\eta$ 、 $\kappa$ 、 $\varepsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\iota$ 、 $\theta$ )が見出されており、それぞれ C 末端部分に共通の触媒領域と 2 あるいは 3 つのシステインリッチドメインを持つ。一方で N 末側にはサブタイプ特異的な調節領域を持ち、その構造の違いによって、発現時期や発現部位に多様性を持つ (Topham, 2006; Goto et al., 2007; Sakane et al., 2007)。DGK $\beta$  はタイプ I DGK に分類されカルシウム結合モチーフである EF-hand を持ち、カルシウム濃度依存性を示すと考えられている。DGK $\beta$  は主に脳内の神経細胞の細胞表面や細胞骨格に発現しており、特に嗅球、皮質、線条体、海馬などの領域で発現が顕著である。その発現はラットにおいて生後 1、2 週間辺りから顕著になる (Adachi et al., 2005)。この時期は、ラット脳においてシナプスが成熟する時期であり、シナプスやその神経伝達受容部であるスパインの形成に DGK $\beta$  が重要な役割を果たしている可能性が考えられている。また DGK $\beta$  の C 末端側 35 アミノ酸残基が欠損したスプライスバリエントが双極性障害患者で確認されており、DGK $\beta$  と高次脳機能や精神疾患病態との関与が示唆されている (Caricasole et al., 2002)。

スパインとは神経細胞の接合部であるシナプスの後部、樹状突起上に存在する棘突起のことで、脳において主に興奮性の神経伝達刺激を受信する役割をもつ。スパインの密度や形態は、脳神経系の発達過程において変化することが知ら

れている (Elston et al., 2009)。成人の脳においてもスパインの構造および数はダイナミックに変動しており、その調節が長期増強 (long term potentiation : LTP) の誘導に関わり、記憶の形成・保持に関与していると考えられている (Lamprecht and LeDoux, 2004)。近年では各種神経疾患や精神疾患において、スパイン障害の病態への関与が認められており、適切なスパインの状態は高次脳機能を維持する上で重要な機能を持つことが明らかになってきた。例えば統合失調症患者 (Glausier and Lewis, 2013; Konopaske et al., 2014)や双極性障害患者 (Konopaske et al., 2014)では皮質第Ⅲ層のスパイン密度が減少していることが報告されており、またてんかんや記憶障害を示す複数の疾患モデル動物において、その症状と海馬スパイン密度の減少との関連性が報告されている (Fiala et al., 2002)。

本研究では、DGK $\beta$  とスパイン構造および高次脳機能との関連を解明する目的で、DGK $\beta$  欠損マウスを作製し、まず第一章では DGK $\beta$  の神経発達過程における役割の検討および DGK $\beta$  欠損マウスのスパイン構造の検討を実施した。第二章においては、DGK $\beta$  の認知機能制御における役割および DGK $\beta$  欠損マウスの認知機能に及ぼすアルツハイマー病治療薬であるメマンチンの作用の検討を行った。最後に、第三章においては DGK $\beta$  欠損マウスの不安、うつ状態や活動量の変化およびそれに及ぼす双極性障害治療薬であるリチウムの作用を評価することで、DGK $\beta$  の感情機能制御における役割を検討し、DGK $\beta$  がスパイン機能を介し、どのように高次脳機能調節に関与しているかの解明を試みた。

## 第1章 スパイン形成における DGK $\beta$ の役割

### 第1節 諸言

近年、シナプス接合部の棘構造であるスパインと神経疾患や精神疾患との関わりが注目されている。実際にてんかん患者では、皮質および海馬のスパイン密度が顕著に低下していることが知られている (Multani et al., 1994)。また統合失調症 (Glausier and Lewis, 2013; Konopaske et al., 2014)や双極性障害 (Konopaske et al., 2014)などの精神疾患でも、大脳皮質第II/III層のスパイン密度が低下していることが報告されている。一方で自閉症 (Ebert and Greenberg, 2013)や脆弱 X 症候群 (Irwin et al., 2000)などの神経発達障害をきたす疾患においては、スパインの形態変化やその密度が上昇することが明らかになってきている。モデル動物を用いた研究も多く実施されており、アルツハイマー病や統合失調症 (Tsai et al., 2004)、自閉症 (Peça et al., 2011)、精神遅滞モデルマウス (Galvez and Greenough, 2005)などで、その症状とスパインの形態や数の変動の関連性が示唆されている。このようなスパインの形態学的、数的な異常は可逆的であると考えられており、Roy 等はスパイン構造を回復させることで消失した記憶を復元させることに成功している (Roy et al., 2016)。即ち、各病態においてスパインの異常に関与する因子を特定し、その発現、機能を調節する薬剤は、上記の疾患の治療薬となり得る。

これまでに複数の DGK サブタイプに関して、樹状突起やスパインの形成に関与することが報告されている。DGK $\zeta$  の過剰発現は、培養神経細胞において、その樹状突起スパイン数を増加させることが報告されている (Kim et al., 2009b)。一方で DGK $\delta$  は神経突起の分岐数を負に制御していることが報告されている (Usuki et al., 2016)。DGK $\beta$  は神経細胞の細胞表面や細胞骨格に発現するタンパク質で、脳内特に皮質や線条体、海馬において高発現している (Goto and Kondo, 1993)。線条体においては、中型有棘神経細胞 (medium spiny neurons: MSNs)の興

奮性シナプス近傍に局在していることが報告されており (Hozumi et al., 2008)、海馬においても、興奮性の非対称性シナプスのスパインへ局在していることが明らかになっている。また海馬神経細胞に DGK $\beta$  を強制発現させることで、樹状突起の分岐数や成熟スパイン様構造が増加することが報告されている (Hozumi et al., 2009)。一方で、その他の脳部位におけるスパイン形成への DGK $\beta$  の関与や、DGK $\beta$  を欠損させた動物におけるスパイン構造の変化に関しては、未だ報告がなく不明である。

本章では DGK $\beta$  欠損マウスを作製し、本動物の脳各部位の組織および神経初代培養細胞を用い、DGK $\beta$  の欠損がスパイン形成にどのように影響を及ぼすかを免疫組織学的手法を用いて検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### 2-1 実験材料

本試験に用いた薬物および試薬は以下の通りである。

Puregene Tissue Core kit A Mouse Tail kit は Qiagen (Venlo, Netherlands)、RIPA buffer、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail I、phosphatase inhibitor cocktail II、cresyl violet、Brain derived neurotrophic factor (BDNF)、Glial cell derived neurotrophic factor (GDNF)は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Sample Buffer Solution、メタノールは Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)、TRIZol Reagent、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR、BCA Protein Assay Kit、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate、Lipofectamine 2000、 $\beta$ -galactosidase staining kit、HEPES 含有ハンクス緩衝液、Neurobasal medium、glutamine、B27、penicillin streptomycin、normal goat serum は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、Tris-Buffered Saline (TBS)は Takara Bio Inc. (Ohtsu, Japan)、

エタノール、キシレンは Kishida Chemical (Osaka, Japan)、ペントバルビタールは Dainippon Sumitomo Pharma (Osaka, Japan)、Can get solution は Toyobo (Osaka, Japan)、Triton X-100、トリス塩基 (tris base)は BIO RAD (Hercules, CA, USA)、Protein A-Sepharose 4B は Amersham Biosciences (Arlington, IL, USA)、EUKITT は O.Kindler (Freiburg, Germany)、Entellan は Merck (Whitehouse Station, NJ, USA)、Epon は日新イーエム (Tokyo, Japan)、Nerve Cell Culture System は Sumitomo Bakelite Co. Ltd. (Tokyo, Japan)より、それぞれ購入した。GFP および DGK $\beta$  adenoviruses ベクターは神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻教授 白井康仁博士より譲渡頂いた。抗 DGK $\beta$  抗体は、山形大学医学部解剖学第二講座教授 後藤薫博士より譲渡頂いた。抗 mGluR5 抗体、抗 PLC $\beta$ 1 抗体、抗 postsynaptic density protein 95 (PSD-95)抗体、抗 Homer1 抗体、抗 Transmembrane AMPA receptor regulatory protein (TARP) $\gamma$ -8 抗体、抗 GluA1 抗体、抗 GluA2 抗体、GluA2 および DGK $\beta$  発現プラスミドベクターは山形大学医学部解剖学第二講座講師(現、秋田大学大学院医学系研究科細胞生物学講座教授) 八月朔日泰和博士より譲渡頂いた。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

DGK $\beta$  の欠損は既知の方法に従い *Sleeping Beauty* トランスポゾンシステムを用いて行った (Horie et al., 2003)。また DGK $\beta$  欠損マウスは9代にわたりバッククロスを重ね、遺伝的背景を C57BL/6NCr1Cr1j マウスに統一した。成体マウスを用いる実験は、雌雄 DGK $\beta$  ヘテロ欠損マウスを交配させることで得た DGK $\beta$  欠損マウスとその野生型同腹子(8~24週齢)を対照群に用いて行った。初代培養のためのマウス胎児を用いた実験は、DGK $\beta$  欠損マウス同士あるいは野生型マウス同士を交配させて得た胎児を使用して行った。マウスは設定温度: 23°C



(許容範囲: 20 ~ 26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40 ~ 70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00 ~ 午後 8:00)に維持された動物飼育舎で飼育した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm)を用い、自由給水下に固形飼料 (CE-2, CLEA Japan, Tokyo, Japan)にて飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学、神戸大学、大阪大学あるいは山形大学の動物実験委員会に実験申請を行い、許可を受けた上で実施した。

遺伝子改変動物の使用にあたっては、上記の各大学が定める倫理規定を遵守した。

#### 2-2-2 マウスジェノタイピング

生後 6 週齢のマウスの尻尾を先端から 5 mm 切り取り、Puregene Tissue Core kit A Mouse Tail kit を用いてゲノム DNA を抽出し、PCR を行い、マウス遺伝子型を同定した。変異型のアレルを検出する目的で、以下の配列のプライマーを用いた。

Dgk $\beta$ -PV122-R3: 5'-GAACAGAACAACAATAGCTTATGTTC-3'

T/BAL: 5'-CTTGTGTCATGCACAAAGTAGATGTCC-3'

また、野生型のアレルを検出する目的で以下の配列のプライマーを用いた。

Dgk $\beta$ -PV122-R3: 5'-GAACAGAACAACAATAGCTTATGTTC-3'

Dgk $\beta$ -PV122-F3: 5'-TAAGTGGATATTAGCCCAGAACTTAG-3'

増幅反応は DNA サーマルサイクラー (Applied biosystem, Foster City, CA, USA) を用いて 40 サイクル行った。1 サイクルの構成は DNA 変性: 94°C 30 秒、アニーリング: 60°C 30 秒、エクステンション: 72°C 1 分間にて行った。

#### 2-2-3 サザンブロット解析

マウスのゲノム DNA を BglII、NcoI の制限酵素を用いて消化した。それらは 1 % agarose 中に断片化した後、トランスポゾン中に存在する配列である lacZ のプローブを用いてハイブリダイズした。またゲノム中からのベクターの消失を確認するため、ゲノム DNA を SpeI の制限酵素を用いて消化した。それらは 0.8 % agarose 中に断片化した後、ベクター中に存在する配列である neo のプローブを用いてハイブリダイズした。

#### 2-2-4 RT-PCR 法

RNA はマウス前脳から TRIzol Reagent<sup>®</sup>の製品マニュアルに従って抽出し、吸光度を測定することで定量した。RNA(0.2 µg)は Super Script III First Strand Synthesis System for RT-PCR<sup>®</sup>の製品マニュアルに従って逆転写し、cDNA を得た。cDNA を鋳型に定量的 PCR を行うことで、DGKβ の mRNA 量を定量した。プライマーは以下の配列のものを用いた。

Forward: 5'-TGTGGACCCTTGAAGGACCATATTTTG-3'

Reverse: 5'-CGGTTTCTTGTTCTTTTGATGAGGGAGCAG-3'

#### 2-2-5 ウェスタンブロッティング

##### 2-2-5-1 試料採取

マウスを断頭し、脳を摘出した。摘出した脳は、氷冷したガラスシャーレの上に置き、海馬、前頭前皮質および線条体に切り分けた。各組織は、マイクロチューブの中に入れ、重量を測定後、液体窒素を用いて急速冷凍した。サンプルはタンパク質抽出時まで-80°C に保存した。タンパク質抽出液は、RIPA buffer 1 mL に対し、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail I および II それぞれ 10 µL ずつ混合して用いた。組織重量の 10 倍量のタンパク質抽

出液を入れ、ホモジェナイザー (Pycotron, Microtec Co., Chiba, Japan) を用いて 30 秒間ホモジナイズした。その後、20 分間氷中に静置させ、10,000 ×g、4°C、20 分間遠心した。遠心した上清を回収し、タンパク質抽出液とした。

#### 2-2-5-2 タンパク質定量

タンパク質定量は BCA Protein Assay Kit の製品マニュアルに従って実施した。すなわち、10 倍希釈したサンプルに Working reagent を添加後、サンプルを 37°C のインキュベーター中で 30 分間反応させ、その後 532 nm の吸光度を Varioskan Flash (Thermo Scientific)を用いて測定した。サンプルは bovine serum albumin を用いた標準曲線より算出したタンパク質濃度を元に、Sample Buffer Solution および RIPA buffer を用いて調整し、-80° C に保存した。

#### 2-2-5-3 電気泳動および転写

タンパク質濃度を調整したサンプルを-80°C から取り出し、氷上で融解させた後 100°C で 5 分間煮沸処理し、室温にて軽くスピンドウンした。1 well 当たりの添加量は、分子量マーカーを 5 µl、各サンプルを 5 µg とした。サンプルを添加後、ゲル 1 枚当たり 20 mA で 90 分間泳動した。泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM tris、40 mM 6-amino hexanoic acid)に 15 分間浸した。転写膜はメタノールに 30 秒間浸し、超純水に 15 分間浸した。その後、anode buffer 2 (25 mM tris)に 15 分間浸した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M tris)に浸したろ紙、anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、2 枚の cathode buffer に浸したろ紙の順に重ね、膜 1 枚当たり 100 mA で 45 分間転写した。

#### 2-2-5-4 ウェスタンブロットティング

転写後、0.03 ~ 0.1% TritonX 100 含有リン酸緩衝生理食塩水 (Triton in phosphate buffer saline: T-PBS: 0.137 M NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>·12H<sub>2</sub>O、1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>)で洗浄し、T-PBS で希釈した 5% スキムミルクに浸して、室温で 1 時間ブロッキングした。その後再び T-PBS で洗浄した転写膜は、Can get solution 1 あるいは T-PBS で希釈した一次抗体に浸し、室温で 1 時間静置させた。その後転写膜は T-PBS で洗浄し、Can get solution 2 あるいは T-PBS で希釈した二次抗体 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) に浸し、室温で 1 時間静置させた。T-PBS で洗浄した後、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate に 5 分間浸した。その後、Luminescent image analyzer LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) および Multi Gauge Ver. 3.0 (Fujifilm) を用いて検出した。一次抗体には、マウス抗 DGK $\beta$  抗体 (1:2000)、抗 G $\alpha$ q/11 抗体 (0.5  $\mu$ g/mL; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)、抗 mGluR5 抗体 (0.5  $\mu$ g/mL)、抗 PLC $\beta$ 1 抗体 (0.5  $\mu$ g/mL)、抗 PSD-95 抗体 (0.5  $\mu$ g/mL)、抗 Homer1 抗体 (0.5  $\mu$ g/mL)、抗 TARP  $\gamma$ -8 抗体 (0.5  $\mu$ g/mL)、抗 GluA1 抗体 (0.5  $\mu$ g/mL)、抗 GluA2 (0.5  $\mu$ g/mL) 抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体 (1:5000; Sigma-Aldrich) を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:4000; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) および HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:4000; Pierce) を用いた。

#### 2-2-6 免疫沈降法

線条体組織は、320 mM sucrose、10 mM EDTA、10 mM EGTA、100 倍希釈した protease inhibitor cocktail、100 倍希釈した phosphatase inhibitor cocktail I および II を含有した 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中でホモジェナイズした。遠心分離によって核分画を除いた上清をさらに 13,800  $\times$ g、4°C、30 分間遠心した。上清を

除いた残渣に、1% sodium deoxycholate および 0.1% Triton X-100 含有 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) を添加し、36°C で 30 分間可溶化した。10,000 ×g、4°C、10 分間遠心し、上清を Protein A-Sepharose 4B を用いて 30 分プレクリアさせた後、5 μg のモルモット抗 DGKβ 抗体、ウサギ抗 GluA2 抗体あるいは Normal IgG と 4°C で一晩反応させた。次いでサンプルと Protein A-Sepharose 4B を混合し 1 時間反応させた後、0.1% Triton X-100、150 mM NaCl 含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄した。SH-SY5Y 細胞は Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA) を用いて、GluA2/pEGFP-N1 と DGKβ、DGKβ-regulatory あるいは DGKβ-catalytic/pcDNA3-FLAG を一過的に共発現させた。細胞は 150 mM NaCl、1% Nonidet P-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、100 倍希釈した protease inhibitor cocktail、100 倍希釈した phosphatase inhibitor cocktail I および II を含有した 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で溶解させ回収した。Protein A-Sepharose を用いて 30 分プレクリアさせた後、ウサギ抗 FLAG M2 抗体あるいは Normal IgG と免疫沈降させた。これらのサンプルは以降、第 1 章 2-2-5-3、2-2-5-4 の方法に準じてウェスタンブロット法を実施した。

## 2-2-7 免疫組織染色法

### 2-2-7-1 組織切片作製

マウスはペントバルビタール麻酔下で開胸し、ペリスタポンプ (Atto, Tokyo, Japan) を用いて生理食塩水を左心室内に注入して灌流し、次いで 4% パラホルムアルデヒドおよび 2% picric acid 含有 0.1 M phosphate buffer (PB: pH 7.4) を 10 分間注入し固定した。その後、脳を取り出し、同固定液中に一晩放置した。固定した脳は 30% スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) に 48 時間浸した後、液体窒素を用いて O.C.T. compound 中に凍結包埋し、クライオスタット (Leica, Tokyo, Japan) を

用いて、 $-20^{\circ}\text{C}$  で厚さ  $20\ \mu\text{m}$  の切片を作製し、MAS コーティングされたスライドガラス (S-9441, Matsunami, Osaka, Japan) に貼付して、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 2-2-7-2 免疫組織染色(DAB 法)

切片は室温で十分に乾燥させた後、 $0.1\sim 0.3\%$  T-PBS にて洗浄した。以下各工程の間では、T-PBS を用いて 5 分間以上洗浄を実施した。 $0.3\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$  含有 T-PBS に 20 分浸した後、 $5\%$  normal goat serum 含有 T-PBS で 20 分間ブロッキングした。 $4^{\circ}\text{C}$  で 72 時間一次抗体と反応させた。その後室温で 2 時間二次抗体と反応させた。その後 Vectastain Elite ABC Reagent および DAB peroxidase substrate kit を用いて染色した。蒸留水で 2 回洗浄し、エタノールおよび Entellan で透徹、封入した。一次抗体には、マウス抗 DGK $\beta$  抗体 (1:2000) を用いた。二次抗体には、biotinylated goat anti-mouse IgG (1:1,000) を用いた。

#### 2-2-7-3 免疫組織染色(免疫蛍光法)

T-PBS で洗浄の後、 $30\%$ 、 $60\%$ 、 $100\%$  メタノールの順に 2 分間ずつ浸した。以下各工程の間では、T-PBS を用いて 5 分間以上洗浄を実施した。 $5\%$  normal goat serum 含有 T-PBS で 20 分間ブロッキングした。 $4^{\circ}\text{C}$  で一次抗体と反応させ、翌日室温で 2 時間二次抗体と反応させた。一次抗体には、モルモット抗 DGK $\beta$  抗体 (1:2000)、ウサギ抗 GluA2 抗体 ( $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いた。二次抗体には、一次抗体の種特異的な alexa fluor 二次抗体 (1:200, Molecular Probes, Inc, Eugene, OR, USA) を用いた。

#### 2-2-7-4 X-gal 染色

X-gal 染色は、 $\beta$ -galactosidase staining kit を用いて行った。切片を PBS で洗浄し

た後、0.2% glutaraldehyde および 1% formalin に浸透させた後 5-bromo-4-chloro-3-indoly  $\beta$ -galactoside を含んだ反応液に 2 時間浸して発色させた。

#### 2-2-7-5 クレシルバイオレット染色

切片は室温で十分に乾燥させたのち、PBS に浸して洗浄した。その後、1% cresyl violet 液に 10 分間浸して染色後、蒸留水で 2 分間 2 回洗浄し、エタノールおよびキシレンを用いて透徹した後、EUKITT 試薬にて封入した。

#### 2-2-7-6 ゴルジ染色

固定した脳は 30% スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 2 から 3 日間浸した後、2% ニクロム酸カリウム溶液に 4°C にて 2 日間浸した。次に 4°C、遮光下で 2% 硝酸銀溶液に 2 日間浸した。染色した脳を 60  $\mu$ m の厚さに薄切し、蒸留水に浸した。切片はスライドグラスにのせ、10 分間乾燥させたのち、エタノールおよびキシレンで脱水透徹した。

#### 2-2-7-8 電子顕微鏡解析

マウスはペントバルビタール麻酔下で、ペリスタポンプ (Atto, Tokyo, Japan) を用いて生理食塩水を左心室内に注入して灌流し、次いで 2% パラホルムアルデヒドおよび 2% グルタルアルデヒド含有 0.1 M PB (pH 7.4) を 10 分間注入し固定した。その後脳を取り出し、厚さが 1 mm で 4 mm 四方の薄切切片を作製し、同固定液中で追固定した。さらに 2% オスミウム酸含有 PB に浸し固定した。エタノールを用いて脱水した後、Epon (quetol-812) を用いて包埋した。超薄切片はメッシュにのせ 2% 酢酸ウラニルおよび Reynolds 試薬で染色した。超薄切片は JEM1200EX electron microscope (JEOL USA, Inc., Peabody, MA, USA) で観察した。

## 2-2-8 初代神経細胞培養

### 2-2-8-1 海馬由来初代神経細胞培養

妊娠後 17-18 日目のマウスはペントバルビタール麻酔下で開腹し、胎児を取り出した後速やかに、放血安楽死させた。取り出した胎児は断頭し海馬を摘出した。摘出した海馬は氷冷した HEPES 含有ハックス緩衝液 ( $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -, pH 7.4) に浸した後、Nerve Cell Culture System を用いて、細胞を単離培養した。培養はガラスボトムディッシュ中で glial-conditioned medium を用いて行った。培地は 3 日ごとに半分量交換した。遺伝子強制発現試験では、培養 3、10、15 日後 (day in vitro: DIV) に adenoviruses NSE-tTA、TetOp-GFP あるいは TetOP-GFP-DGK $\beta$  を添加した。1 時間後培地を交換しさらに 48 時間培養した。4%パラホルムアルデヒドおよび 2% picric acid 含有 PB にて固定後 0.03% T-PBS で洗浄し GFP の蛍光を観察した。免疫細胞染色試験では 3、10、15 DIV の細胞を 4%パラホルムアルデヒドおよび 2% picric acid 含有 PB にて固定後 0.03% T-PBS で洗浄した。以下各工程の間では、0.03% T-PBS を用いて 5 分間以上洗浄を実施した。0.3% T-PBS に 20 分浸した後 5% normal goat serum で 1 時間ブロッキングした。細胞は 4°C で一次抗体と反応させ、翌日室温で 2 時間二次抗体と反応させた。染色した細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510 invert, Carl Zeiss, Jena, Germany) で観察した。一次抗体には、マウス抗 MAP-2 抗体 (1:2000)、ウサギ抗 PSD-95 抗体 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いた。二次抗体は、一次抗体の種特異的な alexa fluor 二次抗体 (1:1000) を用いた。

### 2-2-8-2 MSNs 初代培養細胞培養

実験は DGK $\beta$  欠損マウスと GFP マウスを掛け合わせた個体を用いて実施した。妊娠後 18-19 日目の DGK $\beta$  欠損マウス GFP マウスはペントバルビタール麻



酔下で開腹し、胎児を取り出した後速やかに、放血安楽死させた。取り出した胎児は断頭し線条体を摘出した。同様に妊娠後 18-19 日目の C57BL/6 マウスから皮質を取り出し、パパイン中で解離させた後、3:1 の細胞数割合で 0.5 mM glutamine、B27、1% penicillin streptomycin、50 ng/mL BDNF、30 ng/mL GDNF 含有 Neurobasal medium に懸濁させ、poly-D-lysine コートした dish で培養した。培地は 3 日ごとに 25% 量、BDNF および GDNF を除いた培地と交換した。1、7 DIV の細胞を 4% パラホルムアルデヒド含有 PB にて固定後 0.03% T-PBS で洗浄した。以下各工程の間では、0.03 % T-PBS を用いて 5 分間以上洗浄を実施した。10% normal goat serum で 1 時間ブロッキングした。細胞は室温で一次抗体と反応させ、翌日室温で 2 時間二次抗体と反応させた。染色した細胞は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。一次抗体には、モルモット抗ドパミン D1 受容体抗体 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、ウサギ抗ドパミン D2 受容体抗体(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を用いた。二次抗体には、一次抗体の種特異的な alexa fluor 二次抗体 (1:1000)を用いた。

#### 2-2-9 統計学的解析

実験成績は平均値±標準偏差(SD)あるいは平均値±標準誤差(SEM)で示した。統計学的な比較は、JSTAT (Vector)あるいは Statistical Package for the Social Science 15.0J for Windows software (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて行った。1 要因あるいは 2 要因の分散分析の後 paired *t*-test、Student's *t*-test、Dunnett's test、Tukey's test あるいは Bonferroni test から最適な手法を選択して行った。危険率が 5 % 未満を有意差有りとした。

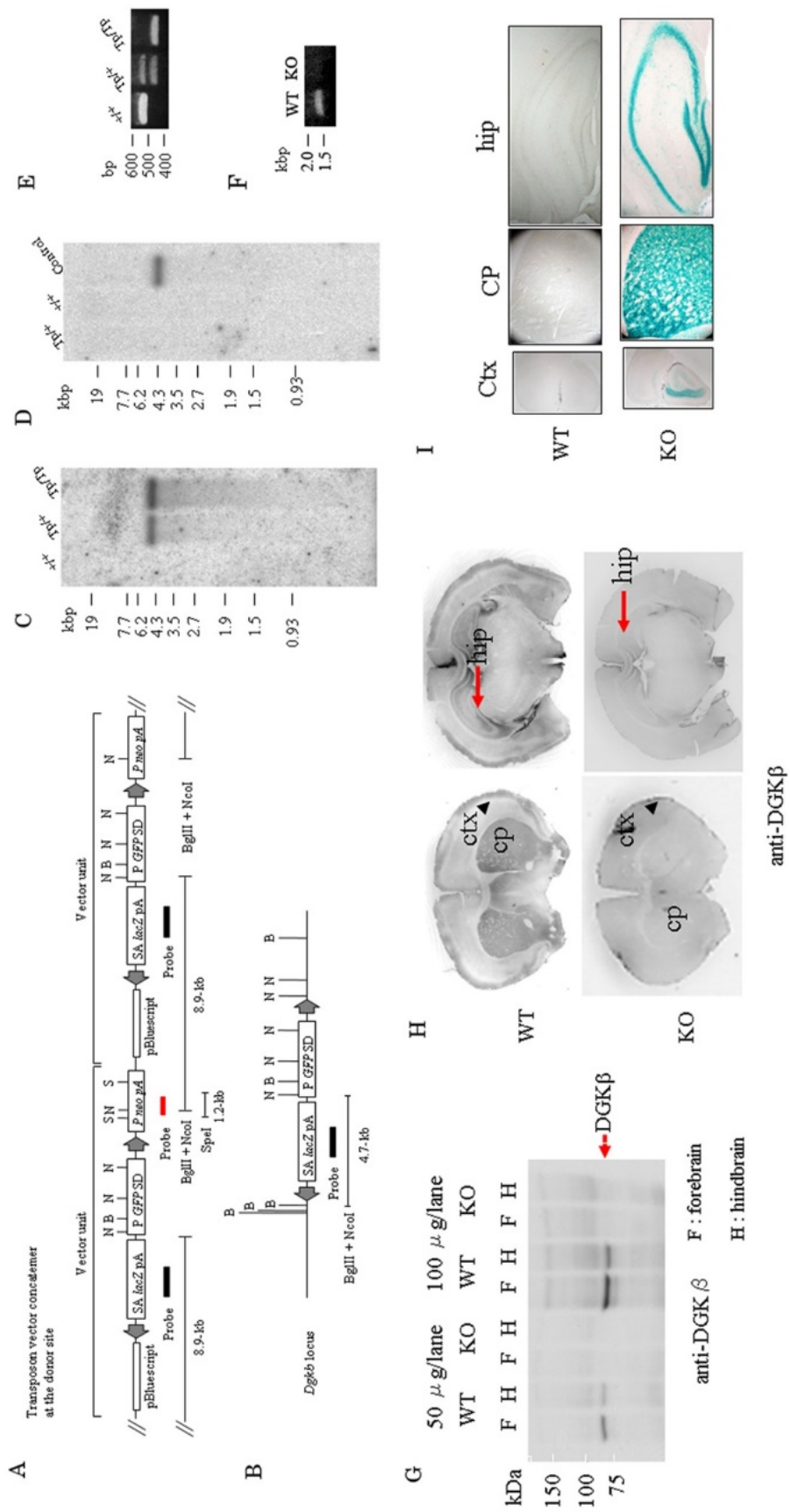
### 第3節 実験成績

#### 3-1 DGK $\beta$ 欠損マウスの作製

DGK $\beta$  の欠損は既知の方法に従い *Sleeping Beauty* トランスポゾンシステムを用いて行った (Fig. 2A, B)。サザンブロット解析の結果、DGK $\beta$  欠損マウスは DGK $\beta$  遺伝子上の 1 箇所のみに変異が生じていることを確認した (Fig. 2C, D)。PCR 法を用いた genotyping (Fig. 2E)、脳組織を用いた RT-PCR 法 (Fig. 2F) および抗 DGK $\beta$  抗体を用いたウェスタンブロット法 (Fig. 2G) と免疫染色法 (Fig. 2H) によって、DGK $\beta$  欠損マウスが DGK $\beta$  を発現していないことを確認した。lacZ 染色の結果、本来 DGK $\beta$  が発現している脳領域において、遺伝子置換の結果挿入された  $\beta$ -galactosidase が発現していることを確認した (Fig. 2I)。

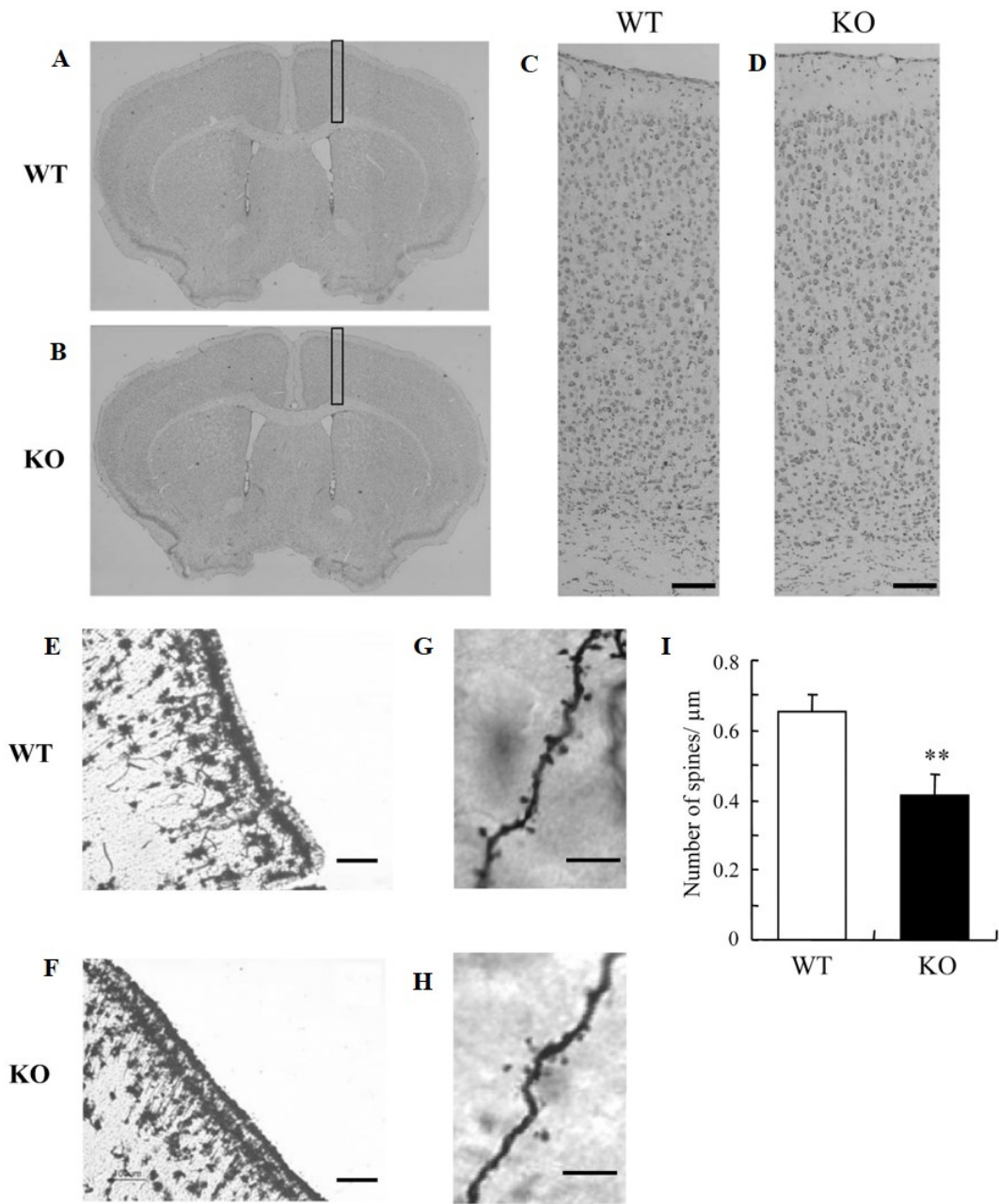
#### **Fig. 2. Characterization of DGK $\beta$ KO mice.**

(A, B) Vector DNA at the donor site and *Dgk $\beta$*  locus. SA, splice acceptor; pA, polyadenylation signal; P, cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin chimeric promoter; SD, splice donor; gray arrows, inverted repeats/direct repeats for transposase-specific binding; B, *Bgl* II; N, *Nco* I; S, *Spe* I. (C, D) Southern blot analysis of gene from wild type (WT) (+/+), heterozygous (Tp/+), and knockout (KO) mouse (Tp/Tp). Genomic DNA was digested with *Bgl*II and *Nco*I and detected with the lacZ probe shown in black. A single band in mutant mice indicates a single transposon insertion site segregated from the donor site (C). Similarly, genome DNA digested with *Spe* I was detected with the probe shown in red. Control represents genome from a control mouse cell line with one copy of neo. No band in the mutant mouse confirmed segregation of the donor site (D). (E) Typical result of PCR for genotyping. Bands at 455 bp and 540 bp are expected from the mutant and WT alleles, respectively. (F) RT-PCR. No band in RT-PCR indicates no mRNA of DGK $\beta$  in KO mice. (G) Western blotting using anti-DGK $\beta$  antibody. Proteins in the homogenate of hind- or fore-brain from WT and KO mice were separated by 7.5% SDS-PAGE, followed by transferring and immunostaining. (H) Immunohistochemistry using DGK $\beta$  antibody and frontal sections from WT and KO mice. (I) X-gal staining. The regions where DGK $\beta$  gene was mutated were determined by incubation with X-gal. Representative images showing cortex (ctx), caudate putamen (CP), and hippocampus (hip) of WT mice (upper) and DGK $\beta$  KO mice (lower). Scale bar=500  $\mu$ m.



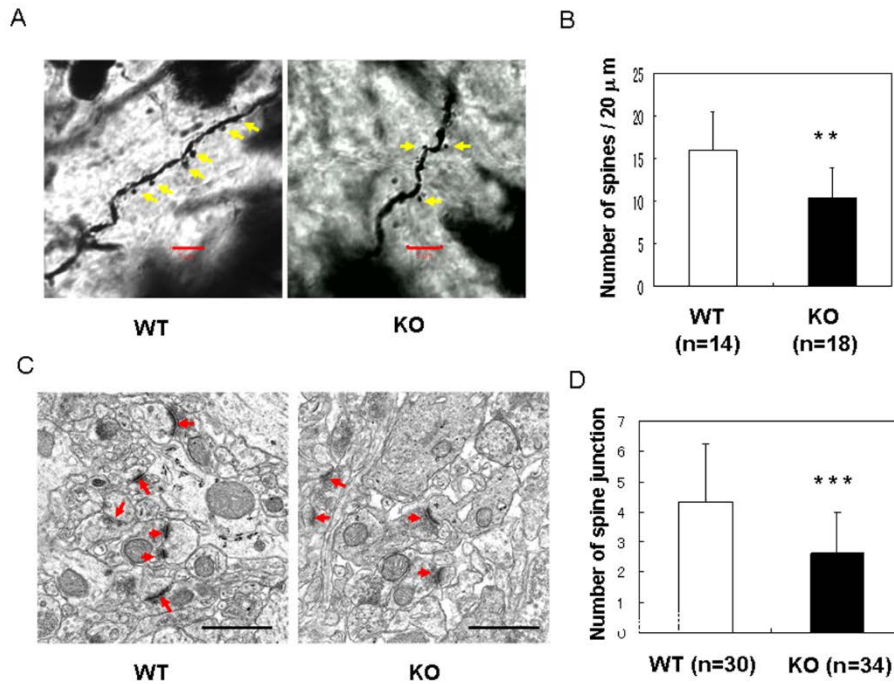
### 3-2 DGK $\beta$ 欠損マウスの皮質および海馬におけるスパイン構造の検討

クレシルバイオレット染色の結果、DGK $\beta$  欠損マウスは、脳の皮質層構造に関して野生型マウスと同様の正常な層構造を有していた (Fig. 3A-D)。一方で DGK $\beta$  の発現が高い部位である、皮質、海馬および線条体組織に関して、神経細胞をスパインレベルまで染色する方法であるゴルジ染色を行った結果、DGK $\beta$  欠損マウスの皮質においてスパイン数の減少が認められた (Fig. 3E-I)。海馬においてはスパイン数および原子顕微鏡を用いた解析によってシナプス接合部の減少が確認された (Fig. 4)。



**Fig. 3. Histological analysis of the cortex in DGKβ KO mice.**

(A–D) Cresyl violet staining. (A, B) Representative photomicrographs show coronal sections stained with cresyl violet. (C, D) DGKβ KO mice showed no defects in the layered structure of the cerebral cortex. Scale bar = 100 μm (E–I) Golgi staining. (E, F) Representative photomicrographs show pyramidal neurons in the cortex stained by Golgi. Scale bar = 100 μm (G, H) Representative photomicrographs show high-magnification images of apical dendritic segments. Scale bar = 5 μm (I) Quantitative analysis of spine density in WT mice and DGKβ KO mice. (n=11 or 15, mean and SEM) \*\* ; p<0.01 vs.WT mice.

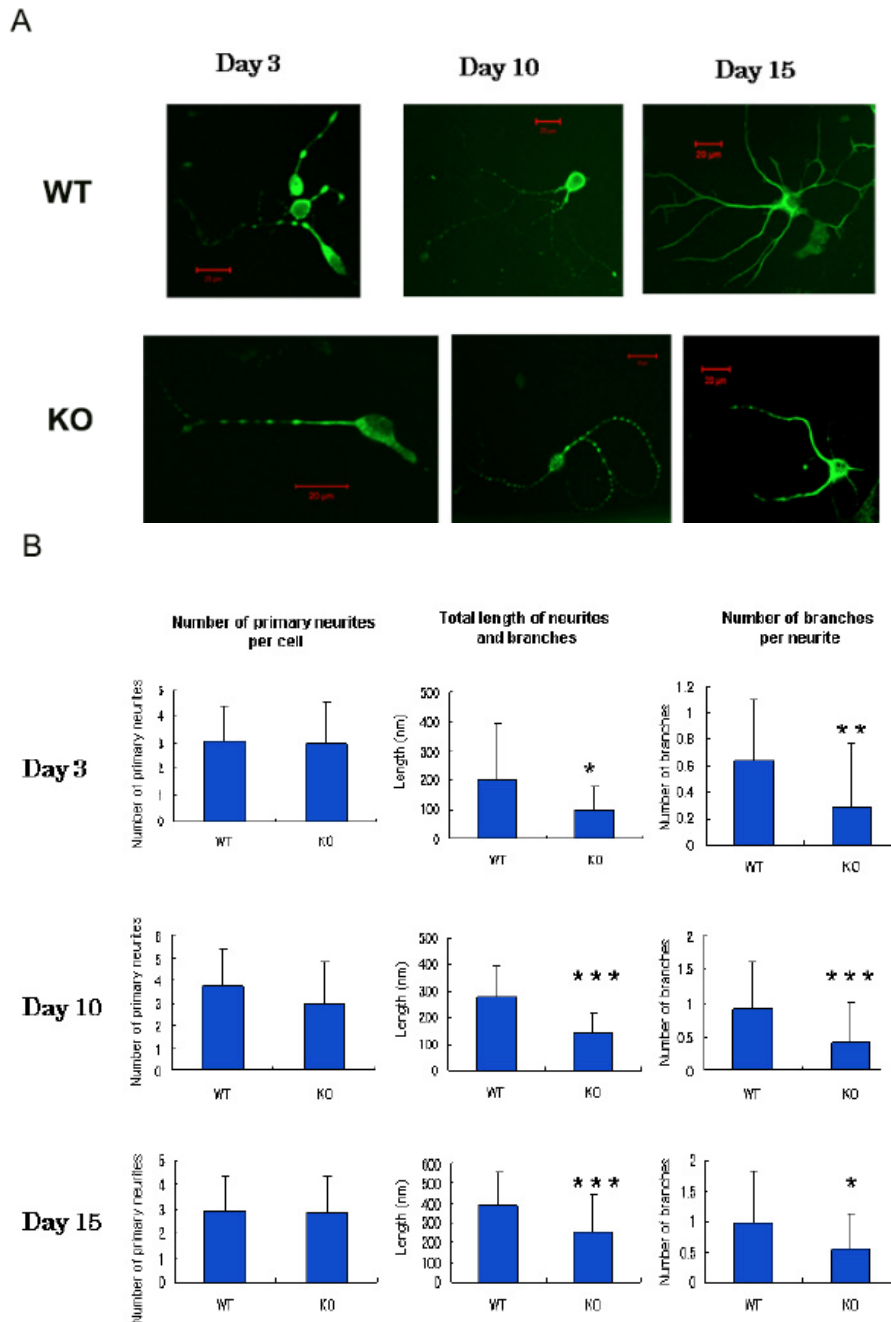


**Fig. 4. Abnormality of synapse density in the hippocampus of DGKβ KO mice.**

(A) Typical Golgi staining of hippocampal neurons at CA1 regions. Yellow arrows show spines. Scale bar represents 5 μm. (B) Comparison of synapse density in the CA1 hippocampal region. The number of synapses was counted and plotted. Each datum point represents the mean and SD (WT, n=14; KO, n=18). \*\* represents  $P < 0.01$  vs. the control of WT. (C) Typical images of electron microscopy. ( $\times 243,000$ ) Scale bar represents 5 μm. (D) Comparison of the number of synaptic junctions. Number of synaptic junctions with PSD in the micrographs was counted. Each datum point represents the mean and SD (WT, n=30; KO, n=34). Red arrows indicate synaptic junctions. \*\*\* represents  $P < 0.005$  vs. the control of WT.

DGKβ が海馬神経細胞のスパイン構造に及ぼす影響をより詳細に解明する目的で、DGKβ 欠損マウスの海馬組織から、初代神経培養細胞を作製し、その形態学的特徴を野生型マウスの初代神経培養細胞と比較した。海馬由来の初代神経培養細胞において、一細胞体あたりの突起数は初代培養 3 日後から 15 日後の期間で、genotype 間の有意な差は認められなかった (Fig. 5)。一方で、突起の長さおよび一突起あたりの分岐数に関しては、初代培養 3 日後、10 日後および 15 日

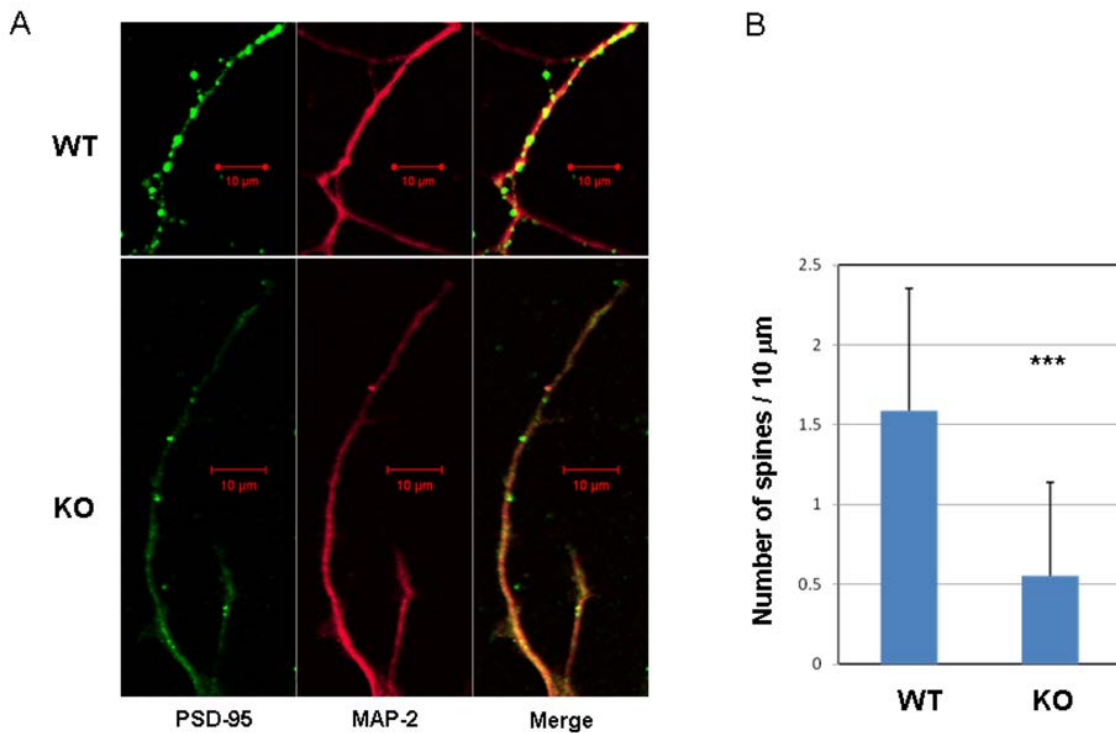
後のいずれの時点においても、野生型マウスと比較し、DGK $\beta$  欠損マウスで有意に減少していた (Fig. 5)。またシナプス後肥厚に発現する PSD-95 の免疫染色をすることで、初代培養細胞のスパイン数を計測すると、培養10日後の細胞において、DGK $\beta$  欠損マウスのスパイン数は有意に減少していた (Fig. 6)。



**Fig. 5. Impairment of neuronal branching in the primary cultured hippocampal neurons from DGK $\beta$  KO mice.**

Hippocampal neurons from WT and KO mice were cultured for indicated days. After fixing, the neurons were immunostained with MAP-2 followed by Alexa488-conjugated secondary antibody, and observed under confocal microscopy. (A) Typical images. Upper panels show lower magnification images and lower panels are magnified ones. Bars are 20  $\mu$ m. (B) Static analysis. Each datum point represents the mean and SD: day 3, WT, n=28 and KO, n=27; day 10, WT, n=37 and KO, n=49; day 15, WT, n=34 and KO, n=31. \*, \*\*, and \*\*\* represent  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , and  $P < 0.005$  vs. the control of WT, respectively.

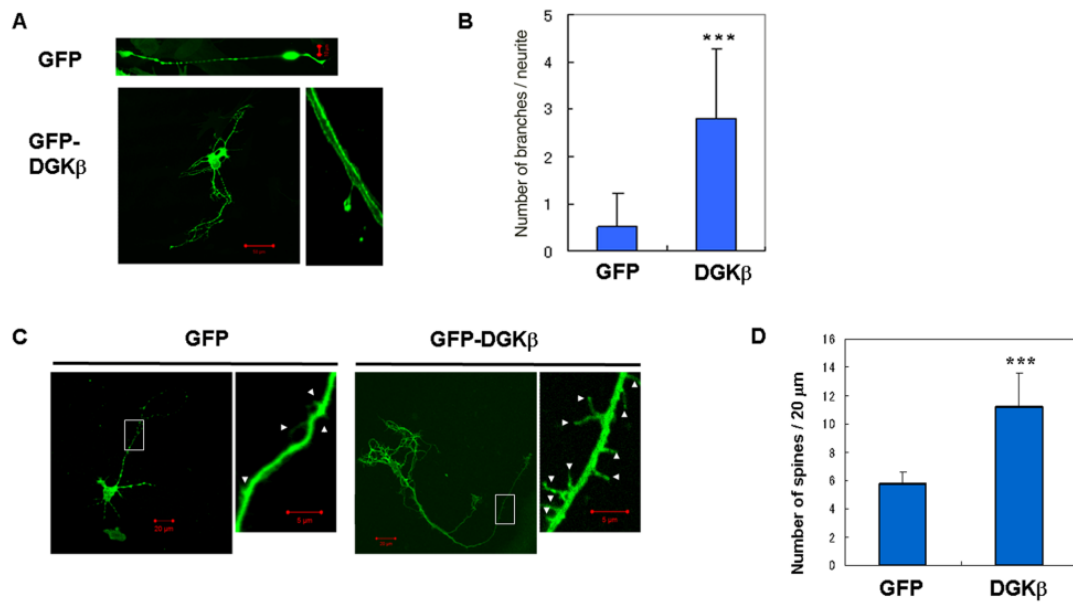




**Fig. 6. Impairment of spine formation in the primary cultured hippocampal neurons from DGK $\beta$  KO mice.**

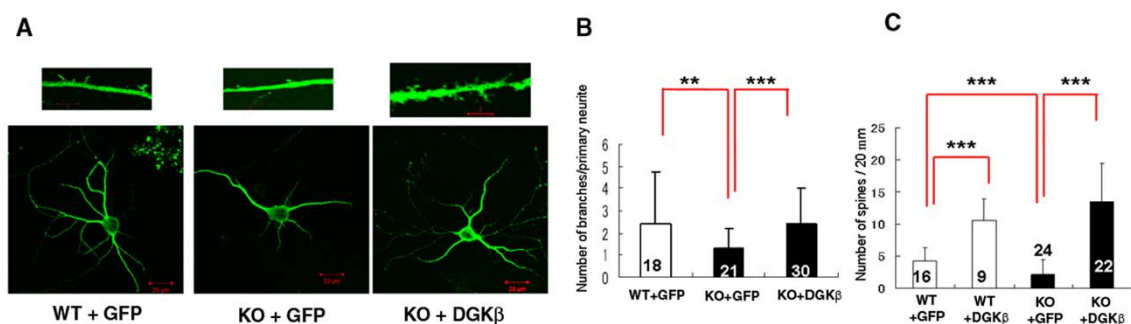
Hippocampal neurons from WT and KO mice were cultured for 14 days. After fixing, the neurons were immunostained with PSD-95 (green) and MAP-2 (red) antibodies followed by Alexa488- and Alexa-594-conjugated secondary antibody. Each datum point represents the mean and SD: WT, n=36 and KO, n=50; \*\*\* represents P<0.005 vs. the control of WT, respectively.

次に、海馬由来の初代培養神経細胞に DGK $\beta$  を過剰発現させた場合のスパインの形態を検討した。野生型マウス由来の初代培養細胞に DGK $\beta$  を過剰発現させると、一突起あたりの分岐数およびスパイン数が有意に増加した (Fig. 7)。同様に DGK $\beta$  欠損マウスの初代培養細胞に DGK $\beta$  を過剰発現させると、一突起あたりの分岐数およびスパイン数は野生型マウスと同等以上に回復した (Fig. 8)。



**Fig. 7. DGK $\beta$ -induced branching and spine formation in the primary cultured hippocampal neurons from WT mice.**

The hippocampal neurons culture for 3 days (A, B) or 10 days (C, D) were infected with respective viruses. (A) Typical images of primary cultured hippocampal neurons overexpressing GFP-DGK $\beta$  or GFP alone. (B) Statistical analysis of number of branches per a single neurite. n=13 for GFP, n=8 for DGK $\beta$ . (C) Typical images of spine-like structures in the primary cultured hippocampal neurons overexpressing GFP-DGK $\beta$  or GFP alone. Magnified images of squared area are shown in right panels. (D) Statistical analysis of spine-like structures. n=18 for GFP and n=15 for DGK $\beta$ . \*\*\* means P<0.005 vs. the control expressing GFP alone. Bars represent 5  $\mu$ m (for magnified images) or 20  $\mu$ m. Each datum point represents the mean and SD.

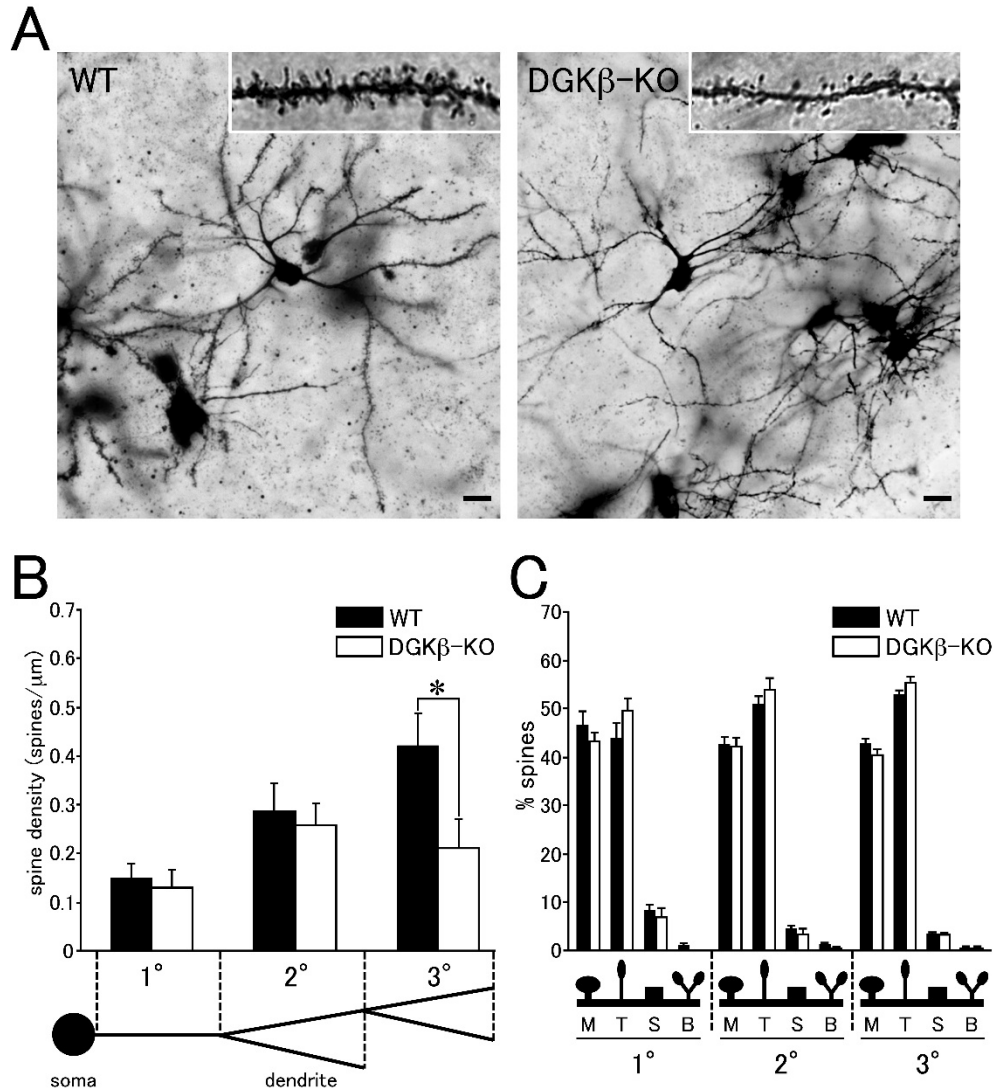


**Fig. 8. Rescue of impaired branching and spine formation in the primary cultured hippocampal neurons from KO mice by DGKβ overexpression.**

(A) Typical images of WT and KO primary cultured hippocampal neurons expressing GFP or GFP-DGKβ, and its distal dendrites with spines (upper panels). Bars are 20 μm or 5 μm (for upper images). (B, C) Comparison between numbers of branches per single neurite (B), and number of spines (C) in primary cultured hippocampal neurons from WT and KO mice. Each datum point represents the mean and SD. Numbers of analyzed samples are shown in the graph. \*\*, and \*\*\* represent  $P < 0.01$  and

### 3-3 DGKβ 欠損マウスの線条体におけるスパイン構造の検討

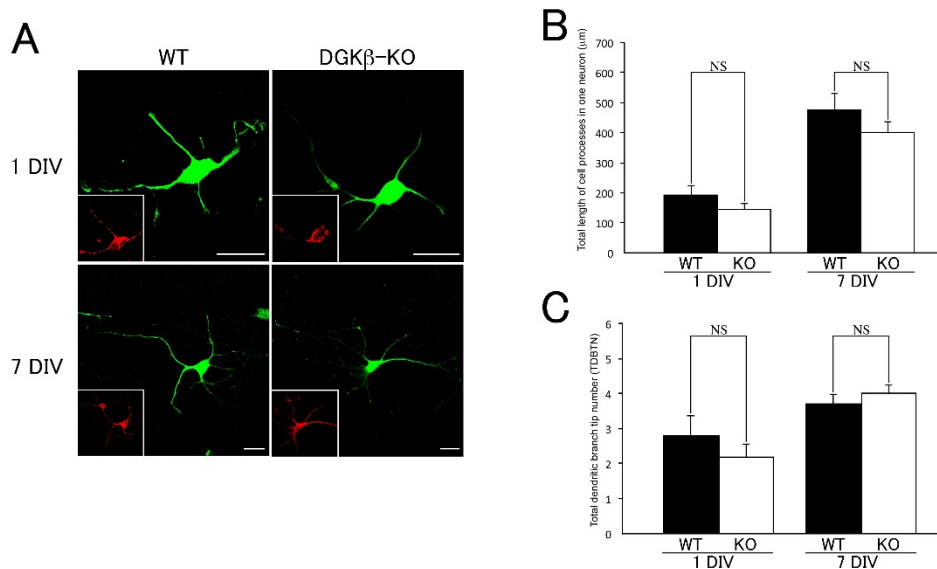
Hozumi らは、DGKβ が線条体において、MSNs に選択的に発現し、興奮性シナプスを構成する棘突起のシナプス後肥厚に近接した細胞の膜領域に局在することを報告している (Hozumi et al., 2008)。本検討においては DGKβ 欠損マウスの MSNs を免疫組織化学、免疫細胞化学的に評価することで DGKβ の MSNs における機能を検討した。DGKβ 欠損マウスおよび野生型マウスの線条体を用いてゴルジ染色を実施し、MSNs のスパイン数を細胞体からの距離ごとに、またスパインの各種形態ごとに計測した。その結果、細胞体から 2 回以上分岐した、より先端の樹状突起上のスパイン数の減少が認められた (Fig. 9A, B)。一方で mushroom(大きなキノコ形の形状)、thin(細長い形状)、stubby(首がなく短い形状) および branched(分岐した形状)型といった、各スパイン形態の割合に関しては genotype 間で差が認められなかった (Fig. 9C)。



**Fig. 9. Golgi-Cox staining of striatal MSNs.**

(A) Photomicrographs showing Golgi-impregnated dendrites of striatal MSNs from WT and DGK $\beta$  KO mice. The insets show high magnification images of distal (tertiary) dendrites in each image. Scale bars, 20  $\mu$ m. (B) Statistically significant reduction of spine density is observed at distal (tertiary) dendrites in DGK $\beta$  KO whereas no changes are detected in proximal (primary and secondary) dendrites. The data are the mean  $\pm$  S.E.M. \* ;  $p < 0.05$ . (C) Note no changes in dendritic spine morphology by the absence of DGK $\beta$  in each dendritic segment of striatal MSNs (WT: 1363 spines, KO: 730 spines). The data are the mean  $\pm$  S.E.M. M, mushroom type; T, thin type; S, stubby type; B, branched type.

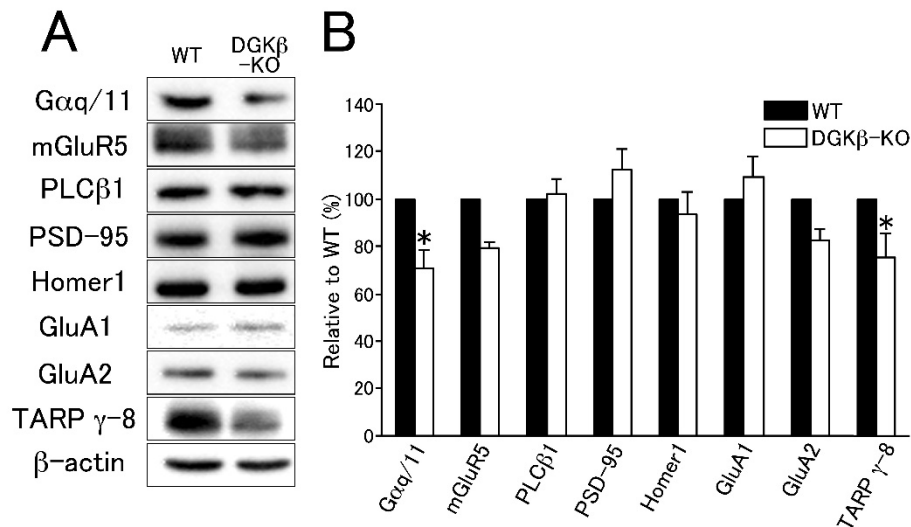
次に MSNs 由来の初代培養神経細胞を作製し、その形態を DGK $\beta$  欠損マウスと野生型マウスで比較した。その結果、軸索と樹状突起の全長および全分枝数に genotype 間の差は認められなかった (Fig. 10)。



**Fig. 10. Quantitative analysis of morphological changes in primary cultured striatal MSNs.**

(A) GFP-labeled primary cultured MSNs from wild-type (WT) and DGK $\beta$  KO mice at 1 and 7 day in vitro (DIV). Green fluorescence outlines the entire configuration of neurons. Red fluorescence in the insets represents dopamine D1R. Scale bars: 20  $\mu$ m. Histogram shows a quantitative analysis of total length of dendritic processes (B) and total dendritic branch tip number (TDBTN) (C) in MSNs of wild-type (WT) and DGK $\beta$ -KO (KO) mice at 1 or 7 DIV. The data are the mean  $\pm$  S.E.M. NS, statistically not significant.

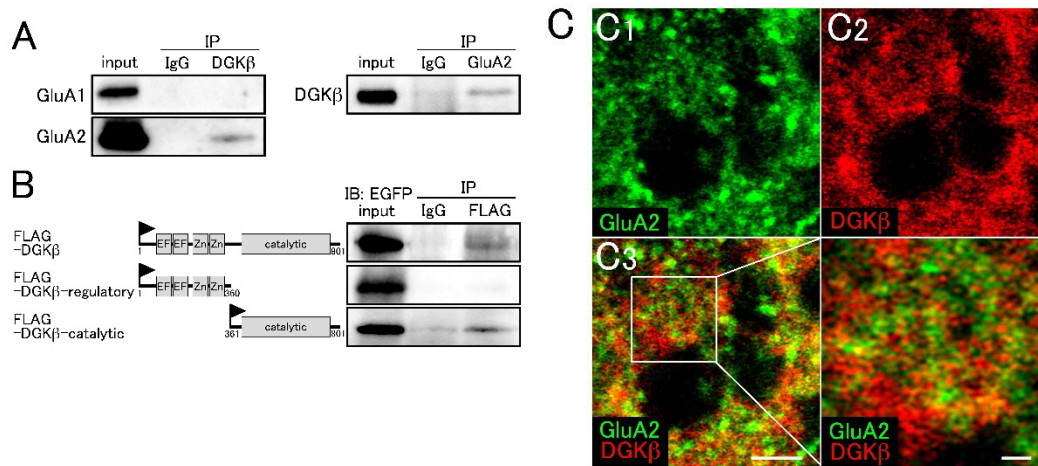
ウェスタンブロット法を用いて、線条体に発現するタンパク質の量を DGK $\beta$  欠損マウスと野生型マウスで比較すると、G $\alpha$ q/11 と TARP $\gamma$ 8 の発現が DGK $\beta$  欠損マウスで有意に低下していた (Fig. 11)。一方で、mGluR5、PLC $\beta$ 1、PSD-95、Homer1、GluA1 および GluA2 の発現は genotype 間で変動が認められなかった (Fig. 11)。



**Fig. 11. Effects of DGKβ deletion on the protein expression profile in the striata.**

(A) Immunoblots with respective antibodies (Gaq/11, mGluR5, PLCβ1, PSD-95, Homer1, GluA1, GluA2, TARP γ-8, and β-actin) on the proteins from striata of WT and DGKβ KO mice. Each lane was loaded with 20 μg of protein. (B) Summary graphs indicate density of immunoreactive bands for each molecule in DGKβ-KO mice normalized to that in wild-type mice. The data are the mean ± S.E.M. (n=3). \*; p<0.05.

また免疫沈降法によって DGKβ と AMPA 型グルタミン酸受容体のサブユニットである GluA2 が共沈することを確認した (Fig. 12A)。GluA2 と DGKβ の関係をより詳細に検討するため、DGKβ の全長、N末側調節領域あるいは C 末側触媒領域に FLAG タグを付加した DGKβ タンパク質断片と EGFP でラベルした GluA2 を SH-SY5Y 細胞に共発現させ免疫沈降法を実施した。その結果、DGKβ の全長および C 末側触媒領域に FLAG タグを付加した断片のみが GluA2 と共沈した (Fig. 12B)。実際に免疫染色法によって DGKβ と GluA2 の発現を確認すると、これらのタンパク質は非常に近接した位置で局在していることが明らかになった (Fig. 12C)。



**Fig. 12. Molecular interaction of DGKβ with GluA2.**

(A) Immunoprecipitation using sodium deoxycholate-extracted fractions of mouse striata. The homogenates from striata were immunoprecipitated with an anti-DGKβ (left panel) or anti-GluA2 (right panel) antibody. The immunoprecipitates and input lysates (5%) were subjected to immunoblotting with anti-GluA1, GluA2, or DGKβ antibody. Note the immunoprecipitable complex formation of DGKβ with GluA2. (B) Cotransfection and immunoprecipitation using FLAG-tagged full-length DGKβ and deletion mutants together with EGFP-tagged GluA2 in SH-SY5Y cells. The immunoprecipitates and input lysates (5%) were subjected to immunoblotting with anti-EGFP antibody. Schematic diagram of the DGKβ constructs used in the experiment. EF; EF-hand motif, Zn; zinc finger motif. The numbers show the amino acid positions. The full-length DGKβ and DGKβ-catalytic, not DGKβ-regulatory, interact with GluA2. (C) Double immunofluorescence for DGKβ and GluA2 in the striatum. C3 is a merged image of C1 and C2. The inset in C3 is enlarged on the right. Note the close apposition or partial colocalization between DGKβ and GluA2. Scale bars: 5 μm (C3); 1 μm (inset).

#### 第4節 考察

Hozumi らの報告によって、DGKβ が海馬および線条体において、スパインの近傍に局在し、その機能に影響を及ぼす可能性が示唆されている (Hozumi et al., 2009)。本研究では DGKβ のスパイン形成に及ぼす役割を詳細に研究する目的で、*in vitro* あるいは *in vivo* において、DGKβ の発現を変動させることで、スパイン

形成にどのように影響を及ぼすかについて検討した。DGK $\beta$  欠損マウスでは、通常 DGK $\beta$  が高発現する部位である皮質、海馬および線条体において、スパイン数の減少が認められた。この結果は DGK $\beta$  がスパインに局在するだけでなく、その形成に重要な役割を有することを示している。

DGK $\beta$  のスパイン形成における機序をより詳細に検討する目的で、海馬あるいは線条体の初代神経細胞を作製し、DGK $\beta$  の発現を変動させることでスパイン様構造の形態にどのように影響を及ぼすかを評価した。海馬を用いた検討において、DGK $\beta$  欠損マウス由来の初代神経細胞ではスパイン数および分岐数が低下しており、ウィルスベクターを用いて、DGK $\beta$  を過剰発現させることで改善した。DGK $\beta$  の欠損によって生じた変化が、それを補うことでレスキューされるというこの結果は、DGK $\beta$  海馬神経細胞のスパイン形成を正に調節するという仮説を強く支持している。しかしながら、神経の分岐に関しては、初代培養細胞において DGK $\beta$  による調節作用が確認できたものの、DGK $\beta$  欠損マウスの海馬組織における変化は確認できなかった。DGK サブタイプの中で、DGK $\zeta$  も海馬に発現し、Rac1 経路を介して神経伸長を促進することが知られている (Kim et al., 2009a)。DGK $\beta$  欠損マウスの海馬において DGK $\zeta$  が代償的に働くことで、神経伸長を補っている可能性が考えられる。DGK $\beta$  が海馬において神経伸長やスパイン形成に及ぼす生理的意義を証明するためには、分子レベルの更なる検討が必要である。

DGK $\beta$  欠損マウス線条体においてスパイン数の減少が確認された一方で、DGK $\beta$  欠損マウス由来の初代 MSNs 細胞では、その神経様突起長および分岐数に関して DGK $\beta$  の欠損による影響は認められなかった。これらは海馬初代神経と相反する結果であり、脳部位によって神経発達に寄与する DGK $\beta$  の程度が異なる可能性が示唆された。DGK $\beta$  欠損マウス線条体においてスパイン数の減少



が樹状突起の先端部で顕著であったことから、線条体において DGK $\beta$  は発達した MSNs のスパイン形成により関与していると考えられる。DGK $\beta$  欠損マウスの線条体において発現が低下していた G $\alpha$ q/11 は、G タンパク質のサブユニットであり、同様に発現が低下していた TARP  $\gamma$ 8 と共に受容体からのシグナルを DG 上流の PLC 経路へと仲介する。TARP $\gamma$ 8 は海馬において、AMPA 型グルタミン酸受容体の発現や局在を調節する重要な因子であることが報告されている (Fukaya et al., 2006)。TARP  $\gamma$ 8 および AMPA 型受容体は共に線条体 MSNs でも発現している。AMPA 型受容体は興奮性シナプスの速い情報伝達において主要な役割を示す (Malinow and Malenka, 2002)。GluA1 から GluA4 の 4 つのサブユニットのヘテロ重合体として構成され、特に GluA2 は大多数の AMPA 受容体の構成要素となっている (Shi et al., 2009)。GluA2 は AMPA 受容体のカルシウム透過性を制御し、スパイン形成を介し LTP や長期抑圧(long term depression : LTD)の形成における重要な役割を担っている (Malinow and Malenka, 2002)。実際に GluA2 を過剰発現させることで海馬神経におけるスパインの大きさおよび密度が増大することが報告されており、一方で GluA2 欠損マウスは海馬歯状回において、成熟型のスパインが減少し、未熟なスパインの割合が高くなっている (Medvedev et al., 2008)。本研究において DGK $\beta$  は、その触媒領域を含む C 末端側で GluA2 と相互作用を示すことを見出した。MSNs において GluA2 は PSD 内に限局した局在を示し、DGK $\beta$  はシナプス近傍に限局するというこれまでの報告 (Hozumi et al., 2008)と合わせて考えると、PSD 側のシナプス境界部で DGK $\beta$  と GluA2 が相互作用していると考えられる。これらの結果を総合的に考えると、DGK $\beta$  の欠損は G $\alpha$ q/11 と TARP  $\gamma$ 8 といった PLC シグナルに重要な因子の減少によって、AMPA 型受容体の機能あるいは局在に影響を及ぼし MSNs におけるスパイン構造に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

## 第2章 認知機能制御における DGK $\beta$ の役割

### 第1節 諸言

脳は入力される知覚や情動などの情報を通じてシナプス構造を、絶えず機能的・構造的に変化させており、この特性は脳の可塑性と呼ばれ、記憶機能の本体である (Lamprecht and LeDoux, 2004)。外部情報によって、シナプス機能・構造が変化する典型的な例として、海馬の LTP という現象が知られている。すなわち、海馬興奮性神経に高頻度刺激を与えることによって、持続したシナプス伝達効率の増強が認められる現象である。この現象はスパインの形成および成熟と密接に関与しており、*N-methyl-D-aspartate* (NMDA)受容体を介したシグナルによって AMPA 受容体がシナプス後膜へ集積することで、スパインの形成や、形態変化が促進され、LTP が生じると考えられている (Malinow and Malenka, 2002)。アルツハイマー病や脳血管障害を原因とする認知症のみならず、統合失調症や双極性障害といった精神疾患においても、スパインや LTP の形成に異常を来たすことで認知機能に障害が生じることが知られている (Green, 2006)。これらの疾患に対する治療薬は限られており、複数の治療薬が存在するアルツハイマー病に関しても、すべてが対症療法であり、認知機能障害を根本から改善する治療薬は存在しない。

メマンチンは日本においてアルツハイマー病の治療薬として承認されている治療薬の一つで、NMDA 受容体の非競合的拮抗薬である。メマンチンは非臨床試験において、アルツハイマー病モデル動物だけでなく、加齢動物や精神疾患モデル動物の認知機能障害も改善する報告がある (Barnes et al., 1996; Minkeviciene et al., 2004; Chung et al., 2015)。また近年の研究によって、メマンチンが自閉症および脆弱 X 症候群のモデルマウスにおいて、スパインを成熟させる作用がある

ことが明らかとなってきた (Wei et al., 2012)。

本研究では、スパイン形成異常を呈する DGK $\beta$  欠損マウスが実際に脳の認知機能障害を示すかを検討するため、海馬 CA1 領域における LTP を測定した。また DGK $\beta$  欠損マウスの学習記憶行動を評価し、NMDA 受容体の発現との関連や、メマンチン投与による影響を評価した。

## 第2節 実験材料および方法

### 2-1 実験材料

本試験に用いた薬物および試薬は以下の通りである。

Sodium chloride (NaCl)、potassium chloride (KCl)、sodium hydrogen carbonate (NaHCO<sub>3</sub>)、magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>)、potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、calcium chloride dihydrate (CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O)、glucose は Nacalai tesque、メマンチン塩酸塩 (Memantine hydrochloride) は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) より購入した。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 実験動物

すべての実験は、雌雄 DGK $\beta$ ヘテロ欠損マウスを交配させることで得た DGK $\beta$  欠損マウスとその野生型同腹子を用いて行った。動物は第 1 章で示した条件で飼育し、行動試験はすべて午前 10:00 から午後 6:00 の間に行った。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学および東北大学の動物実験委員会に実験申請を行い、許可を受けた上で実施した。遺伝子改変動物の使用にあたっては、上記の各大学が定める倫理規定を遵守した。

### 2-2-2 薬物の調整および処置

メマンチン塩酸塩 (2.5 mg/kg)は蒸留水に溶解し、実験に使用した。薬剤あるいはその溶媒は試験開始の 30 分前に 10 mL/kg の容量にて経口投与した。

### 2-2-3 電気生理

7 週から 8 週齢のマウスを使用して実施した。即ちマウスを断頭し、脳を摘出した後海馬を切り出した。摘出した海馬は、ビブラトーム (microslicer DTK1000, 堂阪イーエム, Kyoto, Japan)を用いて、400  $\mu\text{m}$  の厚さにスライスし、室温下 95 %  $\text{O}_2$ 、5 %  $\text{CO}_2$  で持続的に通気させた人口脳脊髄液 (126 mM NaCl, 5 mM KCl, 26 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.3 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.26 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.4 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  および 1.8 % glucose)に浸した。2 時間後スライスを記録用チャンバーに移し、34°C の人口脳脊髄液を 2 mL/min の速度で灌流させた。興奮性シナプス後場電位 (field excitatory postsynaptic potentials: fEPSPs)は双極刺激電極を用いてシャッフアー側枝および交連線維に 0.05 Hz のテスト刺激を与えることで引き起こし、3 M の NaCl を満たしたガラス電極を用い、CA1 放線層で記録した。反応は増幅器 (CEZ-3100; Nihonkohden, Tokyo, Japan)を使用して記録し、fEPSP の立ち上がり相の傾きの最大値は、1 分毎に 3 回の平均値を A/D converter (PowerLab 200, AD Instruments, Castle Hill, Australia)とパソコンを用いて記録した。安定な基底値が得られたら 100 Hz で 1 秒間の高周波刺激 (High frequency stimulation, HFS)を 10 秒間隔で負荷し、テスト刺激は示された期間負荷し続けた。

### 2-2-4 モリス水迷路試験

円形のプール (直径 120  $\times$  高さ 45 cm)に水深が 31 cm になるように水 (22  $\pm$  1°C)を入れた (Fig. 13)。試験は前訓練試行、訓練試行およびプローブ試行の

3 部に分けて行った。

前訓練試行：マウスを試験装置の中央部の水面に放ち、60 秒間泳がせた。

訓練試行：前訓練試行の翌日から 5 日間訓練試行を行った。装置を 4 つの区画 (target、left、right および opposite area)に分け、透明な退避用プラットフォーム (直径 10 cm)を target area の中央、水面下 1 cm の場所に設置した。装置内の任意の 4 か所を開始点とし、その内の 1 か所にマウスを放ち、プラットフォームに到着するまでを 1 回の試行とした。本試行を 30 分間隔で 1 日 4 回行った。なお、各マウスはプラットフォームに到着後 15 秒間その場に滞在させた後回収し、体の水分を拭き取りヒーターを用い十分に保温した。60 秒以内にプラットフォームに到着できなかったマウスは試験実施者によってプラットフォームに誘導し、同様に 15 秒間滞在させた後、回収した。

プローブ試行：最後の訓練試行の 24 時間後にプローブ試行を行った。装置内からプラットフォームを撤去し、opposite area の中央にマウスを放ち 60 秒間装置内を探索させた。マウスが泳いだ軌跡を自動行動追跡解析システム (EthoVision XT, Noldus, Wageningen, Netherland)を用いて記録し、target area に滞在した割合およびプラットフォームからの平均距離を長期記憶の指標として評価した。

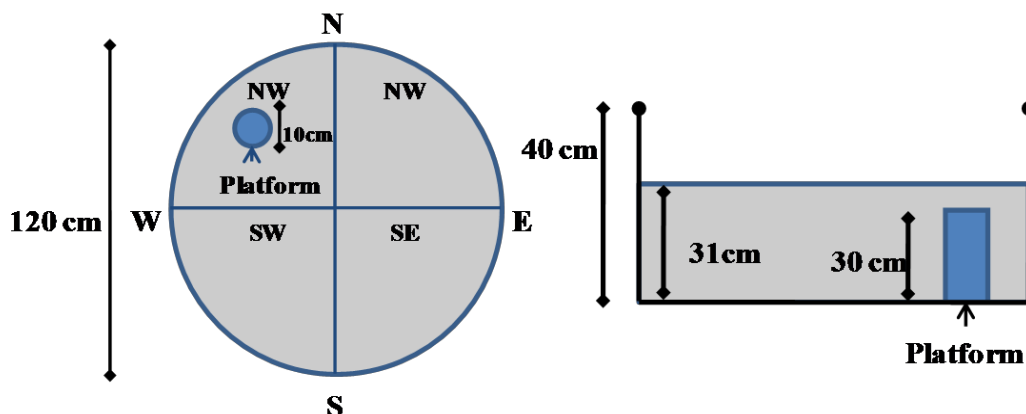


Fig. 13 Apparatus of Morris water maze test.

#### 2-2-5 Y字型迷路試験

試験はプラスチック製の3つのアームを持つY字型の迷路を用いて行った(長さ40×幅10×高さ12cm)。測定は1本のアームの先端にマウスを置き、装置内を8分間自由に探索させた。マウスが元来たアームに戻ることなく3つのアームを順番に探索した場合を、正常なアームの選択(alteration)とする。この場合、正常なアームの最大選択数はマウスがアームに入った回数から2を引いた数であり、正しいアームの選択率(alteration rate)を以下の式に当てはめて求めた。

$$\text{Alteration (\%)} = (\text{正しいアームの選択数} / \text{最大選択数}) \times 100$$

#### 2-2-6 ウェスタンブロッティング

第1章2-2-6の方法に準じて行った。

一次抗体には、ウサギ抗GluRε1 (NR2A)抗体 (1:1000 dilution; Frontier Science, Ishikari, Japan)、ウサギ抗GluRε2 (NR2B)抗体 (1:1000; Frontier Science) およびマウス抗β-actin抗体 (1:5000; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)を用いた。一次抗体反応は4°Cで一晩実施した。二次抗体にはHRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:4000)およびHRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:4000)を用いた。

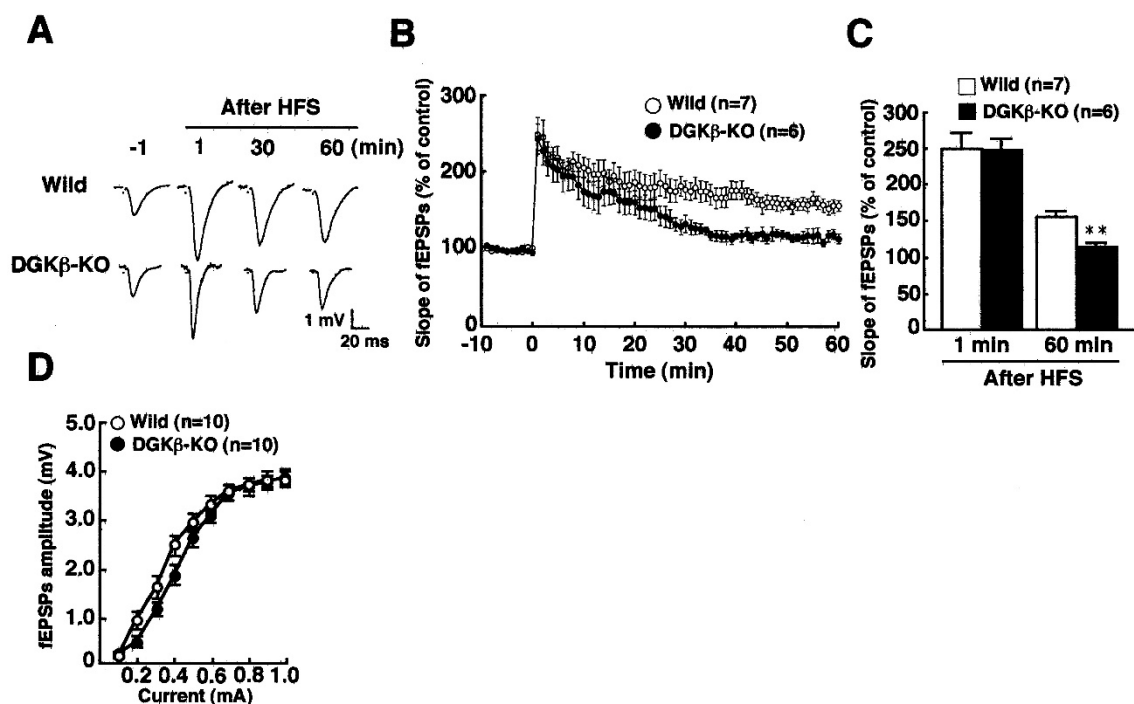
#### 2-2-7 統計学的解析

実験成績は平均値±標準誤差(SEM)で示した。統計学的な比較は、JSTATあるいはSPSSを用いて行った。1要因あるいは2要因の分散分析の後paired *t*-test、Student's *t*-test、Dunnett's test、Tukey's testあるいはBonferroni testから最適な手法を選択して行った。危険率が5%未満を有意差有りとした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 DGK $\beta$ 欠損マウスにおける海馬電気生理学的検討

第一章において DGK $\beta$  が神経細胞の突起伸長やスパインの形成に重要な役割を示し、DGK $\beta$  欠損マウスは脳の各部位においてスパイン数の顕著な減少が生じていることを見出した。DGK $\beta$  欠損マウスにおけるスパイン数の減少がマウスの高次脳機能に影響するか否かを調べる目的で、海馬 CA1 領域の LTP を測定した。野生型マウスから得られた海馬スライスでは、シャプファー側枝および交連線維に高頻度刺激を与えることによって LTP が形成され、60 分以上持続した (Fig. 14A-B)。一方、DGK $\beta$  欠損マウスに同様の処置をすることで得られた LTP の程度は小さく、刺激 60 分後の時点で、野生型マウスと比較し、有意に減弱していた。DGK $\beta$  欠損マウスの Input/Output 曲線は野生型マウスと比べ変化がなかった (Fig. 14D)。



**Fig. 14. Impaired LTP in the DGK $\beta$  KO mice.**

(A) Representative field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) recorded from the CA1 region. (B) Changes in slopes of fEPSPs following HFS in the CA1 region from wild-type and DGK $\beta$  KO mice. (C) Level of LTP potentiation 60 min after HFS in the CA1 region from WT and DGK $\beta$  KO mice.

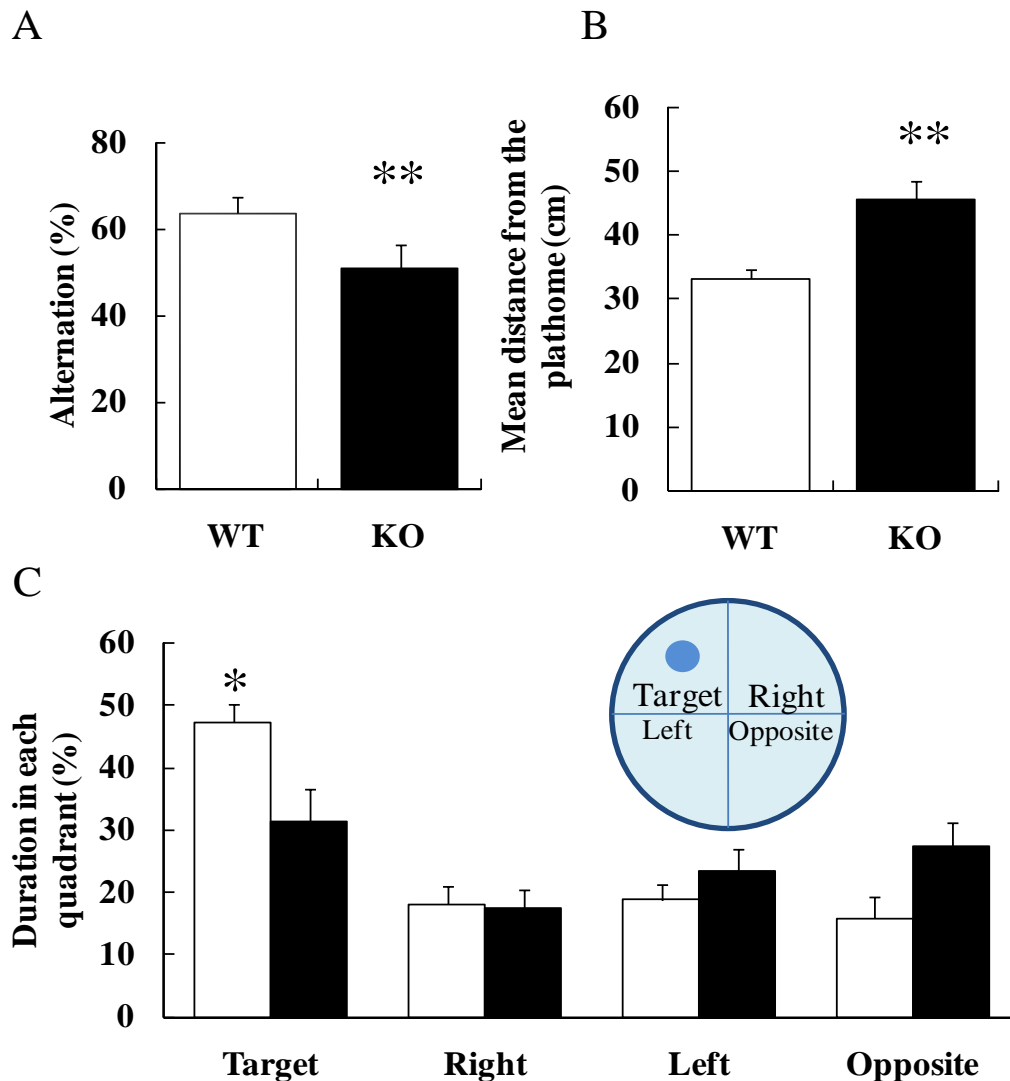
\*\* represents  $P < 0.01$  vs. the control of WT mice. (D) Input-output relationship between WT and KO mice. In the input-output relationship, amplitude of fEPSPs by stimulus intensity at 0.1 mA to 1.0 mA did not affect between DGK $\beta$  KO mice and WT mice.

### 3-2 DGK $\beta$ 欠損マウスの認知機能の行動学的検討

DGK $\beta$  の欠損がマウスの認知・記憶能力にどの様に影響を及ぼすかについて検討する目的で、DGK $\beta$  欠損マウスを用いて Y 字型迷路試験およびモリス水迷路試験を実施した。Y 字型迷路試験において、マウスは通常 Y 字型の通路を、元来たアームに戻ることなく順番に探索行動していく。しかしながら、短期作業記憶の障害を示すマウスにおいては、元来たアームに戻る割合が増加することが知られている (Yamada et al., 1999)。野生型マウスと比べ DGK $\beta$  欠損マウスでは正常なアームの選択率 (alteration rate) が有意に低下していた (Fig. 15A)。モリ



ス水迷路試験では、長期記憶の一つである空間参照記憶を評価した。1日4回、5日間の訓練試行において、マウスにプラットホームの場所を記憶させた。最後の訓練試行の24時間後のプローブ試行において、DGK $\beta$ 欠損マウスは野生型マウスと比較して、プラットホームからより遠い位置を泳いでいた (Fig. 15B)。また野生型マウスはプローブ試行において、訓練試行時にプラットホームが置いてあった区画(target area)に有意に長い時間滞在していたが、DGK $\beta$ 欠損マウスはどのエリアに対しても同程度滞在しており、野生型マウスに比べ target area に滞在していた時間が有意に短かった (Fig. 15C)。



**Fig. 15. Impaired cognitive function in the DGK $\beta$  KO mice.**

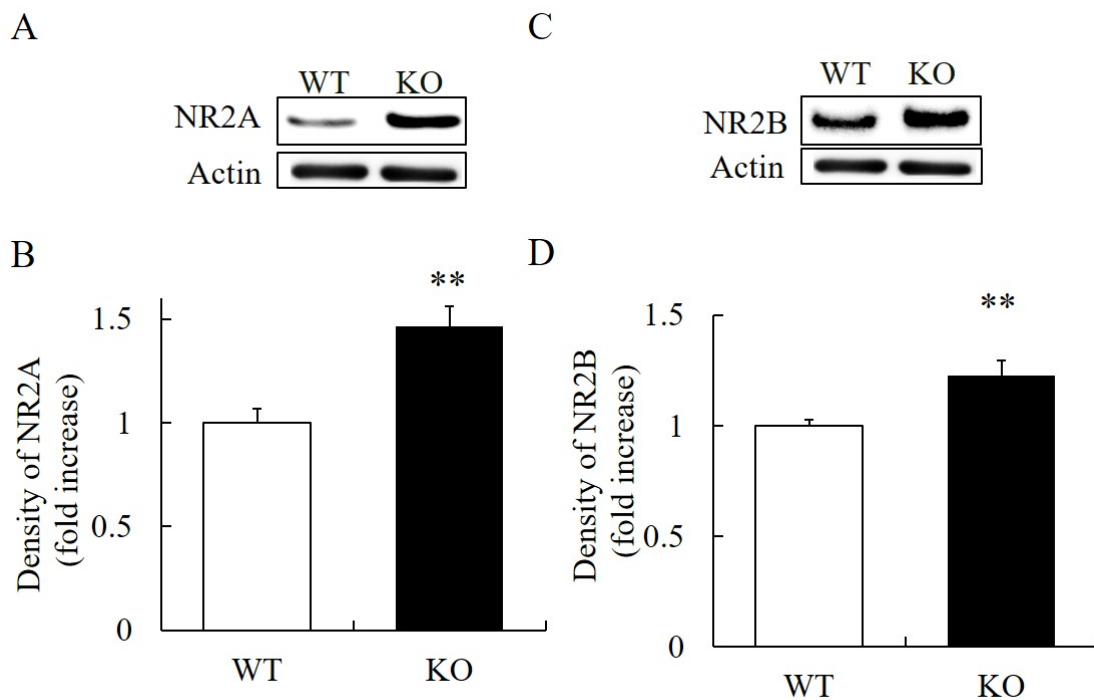
(A) Spontaneous alteration behavior of Y-maze test. WT (n = 9) and DGK $\beta$  KO (n = 7) mice were placed at the end of one fixed arm and allowed to move freely through the maze during 8 min session. (B and C) Morris water maze test of DGK $\beta$  KO mice (n = 9) and their WT litter mates (n = 8). Mice were placed in the opposite quadrant facing the wall and the mean distance from the platform (B) and the time spent in each quadrant (C) were measured. Each column and bar represent mean  $\pm$  S.E.M.

\* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$  vs. WT mice.

### 3-3 DGK $\beta$ 欠損マウスの認知機能異常における NMDA 受容体の関与

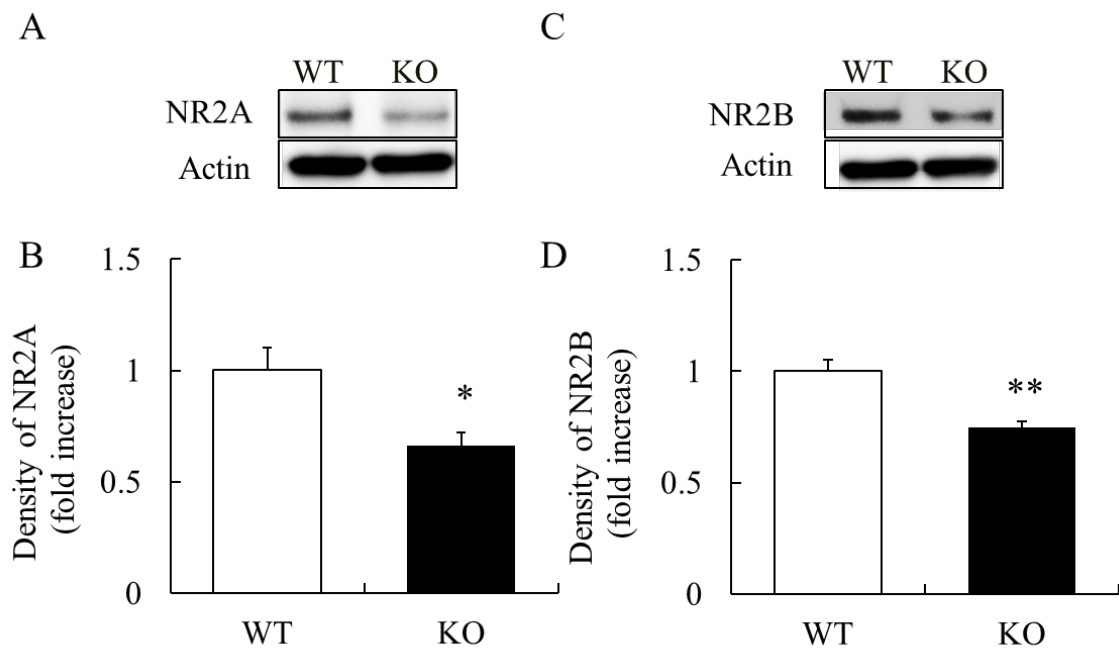
DGK $\beta$  欠損マウスにおいて認められた、認知記憶行動試験の異常に関連する

病態機序を解明する目的で、LTP 形成および認知機能に重要な役割を示す NMDA 受容体の発現量を、ウェスタンブロット法を用いて DGK $\beta$  欠損マウスと野生型マウスで比較した。前頭前皮質において、NMDA 受容体のサブユニットである NR2A および NR2B の発現量が DGK $\beta$  欠損マウスにおいて有意に増加していた(Fig. 16)。一方、海馬においては NR2A および NR2B の発現量が DGK $\beta$  欠損マウスにおいて有意に減少していた(Fig. 17)。



**Fig. 16. NR2A and 2B expression in the cortex of DGK $\beta$  KO mice.**

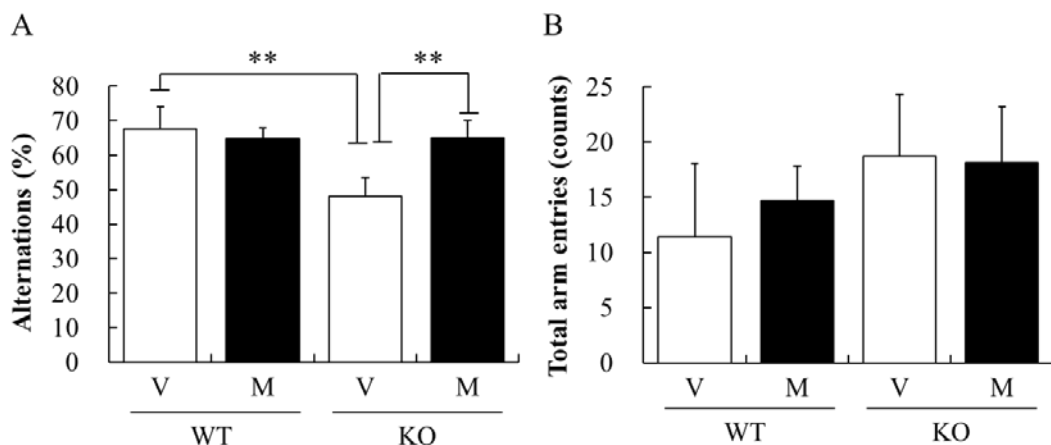
NR2A and NR2B, subunits of the NMDA receptor, levels in the prefrontal cortex were measured using western blot analysis. (A) Representative immunoblot bands showing the expression levels of NR2A and  $\beta$ -actin in the prefrontal cortex of WT (n = 4) and DGK $\beta$  KO (n = 4) mice. (B) Density of NR2A quantified relative to  $\beta$ -actin. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*\* ;  $p < 0.01$  vs. WT mice group. (C) Representative immunoblot bands showing the expression levels of NR2B and  $\beta$ -actin in the prefrontal cortex of WT (n = 7) and DGK $\beta$  KO (n = 7) mice. (D) Density of NR2B quantified relative to  $\beta$ -actin. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*\* ;  $p < 0.01$  vs. WT mice group.



**Fig. 17. NR2A and 2B expressions in the hippocampus of DGKβ KO mice.**

NR2A and NR2B, subunits of the NMDA receptor, levels in the hippocampus were measured using western blot analysis. (A) Representative immunoblot bands showing expression levels of NR2A and β-actin in the hippocampus of WT (n = 4) and DGKβ KO (n = 4) mice. (B) Density of NR2A quantified relative to β-actin. Values are expressed as the mean ± S.E.M. \* ; p < 0.05 vs. WT mice group. (C) Representative immunoblot bands showing the expression levels of NR2B and β-actin in the hippocampus of WT (n = 7) and DGKβ KO (n = 7) mice. (D) Density of NR2B quantified relative to β-actin. Values are expressed as the mean ± S.E.M. \*\* ; p < 0.01 vs. WT mice group.

DGK $\beta$  欠損マウスにおいて NMDA 受容体の発現が変動しており、その機能に影響を及ぼしている可能性が示唆されたため、NMDA 受容体の阻害薬であるメマンチン塩酸塩を投与し、DGK $\beta$  欠損マウスの認知機能に及ぼす影響を評価した。Y 字型迷路試験において、メマンチン 2.5 mg/kg を投与された DGK $\beta$  欠損マウスの正答率は蒸留水を投与された対照群と比較して、有意に改善しており、野生型マウスと同程度であった(Fig. 18A)。メマンチンの投与は、野生型マウスの Y 字型迷路試験における正答率に影響を及ぼさなかった(Fig. 18A)。この試験条件において、Y 字型迷路内の総アーム侵入数は各群で有意な差は認められなかった(Fig. 18B)。



**Fig. 17. The effects of memantine on the cognitive deficit of DGK $\beta$  KO mice.**

Each mouse (n = 10 for each group) was treated with either memantine (2.5 mg/kg, p.o.) or vehicle and performed the Y-maze test 30 min later. (A) The effect of memantine on spontaneous alternation behavior in Y-maze test. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*\* ; p < 0.01 (with one-way ANOVA and followed by Bonferroni's multiple comparison test.) (B) The effect of memantine on the number of total arm entries in the Y-maze test. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. V; vehicle treated group, M; memantine treated group.

#### 第4節 考察

本研究において、DGK $\beta$  は海馬 CA1 領域における LTP の形成に重要な役割を示すこと、そして DGK $\beta$  の欠損によって作業記憶や空間参照記憶といった認知機能に障害を及ぼすことを明らかにした。さらに DGK $\beta$  欠損マウスにおける作業記憶の障害は、アルツハイマー病治療薬であるメマンチンによって改善することを明らかにした。第1章において DGK $\beta$  の欠損が脳においてスパインの形成に重要な役割を持つことを示した。中でも、皮質や海馬などの領域はそれぞれ作業記憶および空間参照記憶といった認知・記憶に関する高次脳機能に中心的な役割を担う脳部位である。本研究の結果は、DGK $\beta$  の欠損によるスパインの組織学的な変化が、海馬における LTP の減弱という脳機能の異常へ、そして学習記憶行動の異常という個体の行動に関連して影響を及ぼしていることを示しており、DGK $\beta$  が認知機能制御に重要な役割を有するタンパク質であることを示唆している。

DGK $\beta$  欠損マウスは LTP の形成や認知機能に重要な NMDA 受容体の NR2 サブユニットに関して、前頭前皮質では発現が上昇し、海馬では発現が低下していた。このように前頭前皮質と海馬で、相反する NR2 サブユニットの発現を示すマウスの報告はこれまでにない。NR2A あるいは NR2B を欠損させたマウスは、海馬依存的な記憶障害を呈する (Sakimura et al., 1995; Bannerman et al., 2008; von Engelhardt et al., 2008)。より詳細な研究として、海馬選択的に NR2B を欠損させたマウスにおいても、海馬依存的な記憶障害が生じることが報告されている (von Engelhardt et al., 2008)。これらの報告は NR2 サブユニットの発現量が海馬依存的な認知機能に重要であることを示している。DGK $\beta$  欠損マウスが海馬 LTP の低下やモリス水迷路試験で障害を示す結果もこれらの報告を支持する結果である。一方、NR2 サブユニットの発現上昇と認知機能との関わりに関しては、

未だ議論の余地がある。例えば NR2B を過剰発現させたマウス(Tang et al., 1999)において認知機能が亢進している一方で、前頭前皮質のみで NR2A、NR2B サブユニットが発現亢進している新生児期フェンシクリジン投与 (neonatal Phencyclidine: nPCP)モデルは、皮質依存的な作業記憶障害を呈する統合失調症モデルマウスである (Owczarek et al., 2011)。これらの報告の相違点は、NR2A の発現上昇の有無と、NR2B の発現部位である。DGK $\beta$  欠損マウスの NR2 サブユニットの発現のみでなくスパインの形成異常や作業記憶において nPCP モデルと類似した結果を示している。

以上の事より、DGK $\beta$  欠損マウスは前頭前皮質特異的に NR2 サブユニットが発現上昇していることで作業記憶に障害が生じており、メマンチンは前頭前皮質の NMDA 受容体機能を調節することで、その作業記憶を改善していると考えられる。一方、1) NR2 サブユニットの発現上昇がそのリン酸化等を介し NMDA 受容体の機能をどのように調節しているか、2) NR2 以外のサブユニットの発現はどう変動しているのか、そして 3) 海馬依存的なモリス水迷路試験結果や LTP の形成そして DGK $\beta$  欠損マウスのスパイン構造にメマンチンはどう作用するのかなどについては未だ明らかになっておらず、今後の更なる研究が必要である。

### 第3章 感情機能制御における DGK $\beta$ の役割

#### 第1節 諸言

精神疾患とは統合失調症や双極性障害、うつ病などに代表され、脳の機能的、器質的異常を原因とした認知、気分あるいは身体的症状を呈する疾患である。近年、精神疾患の患者数は顕著に増加してきており、それに伴い、各種精神疾患に対する治療薬の開発も活発に実施されている。その治療における薬剤の貢献度は統合失調症で 60%以上、うつ病では 70%以上と高い貢献度を示すが、治療満足度に関してはいずれも 50%以下と低く依然としてアンメットメディカルニーズが高い疾患群である（ヒューマンサイエンス振興財団、60 疾患の医療ニーズ調査と新たな医療ニーズ II より）。

双極性障害は気分の高揚（躁状態）と抑うつ（うつ状態）を繰り返す精神疾患であり、躁状態の程度により双極 I 型障害（躁状態が顕著なもの）と双極 II 型障害（躁状態が軽度のもの）に分類される。その発症には複数の遺伝子と、環境要因が複雑に関与しており、多因子性遺伝疾患であると考えられている。生涯罹患率は 1 から 3%程度であり、罹患率の男女差はない。単極性のうつ病では、多くの場合適切な薬物治療等によって完治が見込まれる一方、双極性障害は再発リスクの高い疾患であり、症状が寛解したとしても薬物投与を中止すると再発を繰り返す特徴をもつ。そのため双極性障害患者は生涯にわたり薬物の治療および再発予防のための投与を必要とする。現在双極性障害を適応として、リチウム、バルプロ酸などの気分安定薬や、アリピプラゾール、クエチアピンなどの非定型抗精神病薬が用いられている。しかし治療域の狭さや、副作用の発現頻度が高いことなどの問題点が多く残されており、有効性と安全性を兼ね備えた新薬の開発が望まれている。



各種疾患の治療薬開発のためには、その疾患の遺伝的特徴や病態生理を反映した動物モデルを用いた研究が有用である。我々は DGK $\beta$  の C 末端が欠損したスプライスバリエントが双極性障害の発症に関与するという報告 (Caricasole et al., 2002) に基づき、DGK $\beta$  欠損マウスを作製した。本章では DGK $\beta$  欠損マウスの行動学的解析を実施し、DGK $\beta$  の活動性、抑うつ状態、不安状態に及ぼす影響を検討した。また DGK $\beta$  欠損マウスの示す行動異常に対し、双極性障害治療薬であるリチウム塩が改善作用を示すか否かを評価した。

## 第2節 実験材料および方法

### 2-1 実験材料

本試験に用いた薬物および試薬は以下の通りである。

塩化リチウム、イミプラミン塩酸塩、ジアゼパム、0.5% carboxymethylcellulose は、Wako Pure Chemical Industries より購入した。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 実験動物

すべての実験は、雌雄 DGK $\beta$  ヘテロ欠損マウスを交配させることで得た DGK $\beta$  欠損マウスとその野生型同腹子を用いて行った。動物は第 1 章で示した条件で飼育し、行動試験は自発運動量測定試験を除きすべて午前 10:00 から午後 6:00 の間に行った。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。また、遺伝子組換え動物は、岐阜薬科大学バイオセーフティー委員会に遺伝子組み換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

#### 2-2-2 薬物の調整および処置

薬物の単回投与試験において、塩化リチウム (100, 200 mg/kg) およびイミプラミン塩酸塩 (20 mg/kg) は生理食塩水に溶解し、ジアゼパム (3 mg/kg) は 0.5% carboxymethylcellulose に懸濁し、実験に使用した。各薬剤またはそれらの溶媒は 10 mL/kg の容量にて腹腔内投与した。慢性投与試験において、薬剤投与群には塩化リチウムを 600 mg/L の濃度で蒸留水に溶解し、10 日間飲水投与した。対照群には同期間、蒸留水を飲水投与した。

#### 2-2-3 自発運動量測定試験

通常マウスを飼育しているケージと同型のケージ (ホームケージ) に赤外ビーム式センサー (NS-AS01, Neuroscience, Tokyo, Japan) を設置し、自発運動量を測定するマウスを 1 匹ずつ入れた。マウスの自発運動量は、接続中継ユニット 8CH (NS-HUB01, Neuroscience) を介して、データ収録・解析システム (NS-DAS32, Neuroscience) で 10 分間隔にて 48 時間測定し、データ解析用コンピュータユニット (Multidigital 32-port Counter System, Neuroscience) で集計・解析した。測定開始は午後 0 時とした。最初の 24 時間は測定環境への馴化期間とし、後半の 24 時間の値をホームケージにおける自発運動量の指標として用いた。

#### 2-2-4 オープンフィールド試験

各マウスに薬物投与を実施し、その 30 分後に 1 匹ずつオープンフィールド装置 (縦 35 × 横 35 × 高さ 15 cm) に入れ、1 時間の総移動距離および中央滞在時間を EthoVision XT で測定・解析した。また最初の 10 分間の引っ掻き行動 (スクラッチング) 回数を、カウンターを用いて計測した。

#### 2-2-5 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験装置は、壁の無い走行路 (open arm: 縦 30 × 横 5 cm) と壁で囲まれている走行路 (closed arm: 縦 30 × 横 5 × 高さ 15 cm) が十字に交叉し、床から 50 cm の高さに走行路を設定したものをを用いた。単回投与試験において、各マウスは薬物投与 30 分後に装置中央部分 (縦 5 × 横 5 cm) に顔を open arm 側へ向けて置き、10 分間にわたって迷路内を自由に探索させた。10 分間の open arm 滞在時間、open arm 進入回数および装置からの落下回数を測定した。慢性投与試験においては、薬物投与の前後に 2 回試行を実施し (pre/post test)、pre test での open arm 滞在時間に対する post test の open arm 滞在時間の割合を評価した。解析には Etho Vision XT を使用した。

#### 2-2-6 強制水泳試験

各マウスは薬物投与 30 分後に、水 (25 ± 1°C) の入ったシリンダー (直径 10 × 水深 10 cm) に 6 分間浮かべ、後半 5 分間における無動時間を測定した。マウスが無抵抗に水に浮かび、水面から顔を出すのに必要な最小限の動きをのみをしている時を「無動」とみなした。

#### 2-2-7 尾懸垂試験

マウスは薬物投与 30 分後に、高さ 50 cm に設置された台に、サージカルテープを用いて、尻尾の先端から約 1 cm の場所で固定した。7 分間の試行中、後半 6 分間におけるマウスの無動時間を Etho Vision XT を用いて自動的に測定した。

#### 2-2-8 プレパルスインヒビション (Prepulse inhibition : PPI) 試験

試験は小動物用驚愕反応測定装置を用いて行った。測定装置は、防音箱内に振動センサーのついた保定シリンダーおよび音刺激を付加するためのスピーカー部位と制御用コンピューター部位からなる小動物用驚愕反応測定装置 (SR-LAB; San Diego Instruments, CA, USA)を用いた。Pulse (P)に対する驚愕反応を、振動センサーを介して amplitude として測定した。なお、測定中は外界から音を遮断する目的で 70 dB の background white noise を常時負荷した。マウスを測定装置に入れ 5 分間順化させた後、次の 6 刺激 a) 無刺激 (background white noise): BG、b) 80dB (40 ms) (prepulse のみ): PP、c) 120 dB (40 ms): P、d) 73 dB (20 ms)の prepulse + 120dB (40 ms) (100 ms onset to onset): 3D、e) 76dB (20 ms)の prepulse+120 dB (40 ms) (100 ms onset to onset): 6D、f) 82 dB (20 ms)の prepulse+120 dB (40 ms) (100 ms onset to onset): 12D を無作為に各 3 回 (合計 18 回)、試行間隔平均約 30 秒にて動物に負荷し、音刺激 65 ms 後に認められる保定シリンダーの振動を測定してつぎの式に当てはめて PPI を計算した

$$\text{PPI (\%)} = 100 - (3\text{D、} 6\text{D、} 12\text{D の 3 回平均値}) / \text{P の 3 回平均値} \times 100$$

#### 2-2-9 社会性行動試験

別ケージで飼育されたマウス 2 匹を新奇プラスチックケージ内で 20 分間遭遇させ、最初の 10 分間の接触回数と接触時間をカウンターとストップウォッチを用いて測定した。

#### 2-2-10 ウェスタンブロッティング

第 1 章 2-2-6 の方法に準じて行った。

一次抗体には、ウサギ抗 phospho-Akt (Ser473) (193H12)抗体、ウサギ抗 Akt 抗体、ウサギ抗 phospho-GSK-3 $\beta$  (Ser9) (5B3)抗体、ウサギ抗 GSK-3 $\beta$  (27C10)抗体

(1:1000 dilution: Cell Signaling, Beverly, MA, USA)およびマウス抗  $\beta$ -actin 抗体 (1:5000 dilution: Sigma Aldrich)を用いた。一次抗体反応は 4°C で一晩実施した。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG(1:4000)および HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:4000)を用いた。

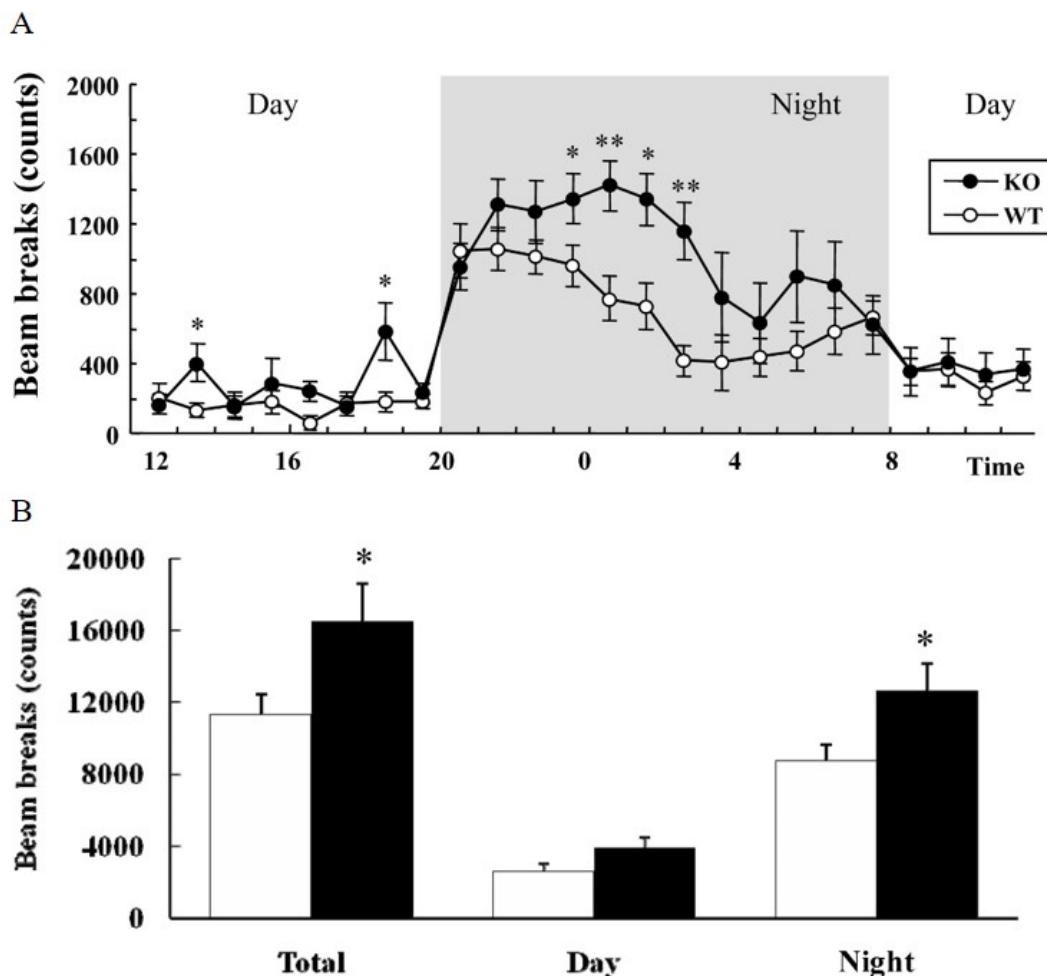
#### 2-2-11 統計学的解析

実験成績は平均値 $\pm$ 標準誤差(SEM)で示した。統計学的な比較は、JSTAT あるいは SPSS を用いて行った。1 要因あるいは 2 要因の分散分析の後 paired *t*-test、Student's *t*-test、Dunnett's test、Tukey's test あるいは Bonferroni test から最適な手法を選択して行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 DGK $\beta$ 欠損マウスの活動量の評価およびリチウムの効果

DGK $\beta$  欠損マウスの通常飼育環境下での活動量およびサーカディアンリズムを評価する目的で、ホームケージでの活動量を 24 時間にわたって測定し、野生型マウスと比較した。いずれの genotype も昼間と比較し、夜間で活動量が亢進しており、正常なサーカディアンリズムを示した(Fig. 19B)。昼間の総運動量に関して、DGK $\beta$  欠損マウスは野生型と同程度であった。一方で活動期である夜間の運動量は、DGK $\beta$  欠損マウスが野生型と比較して有意に増加していた(Fig. 19A)。



**Fig. 19. Locomotor activity test of WT and DGK $\beta$  KO mice.**

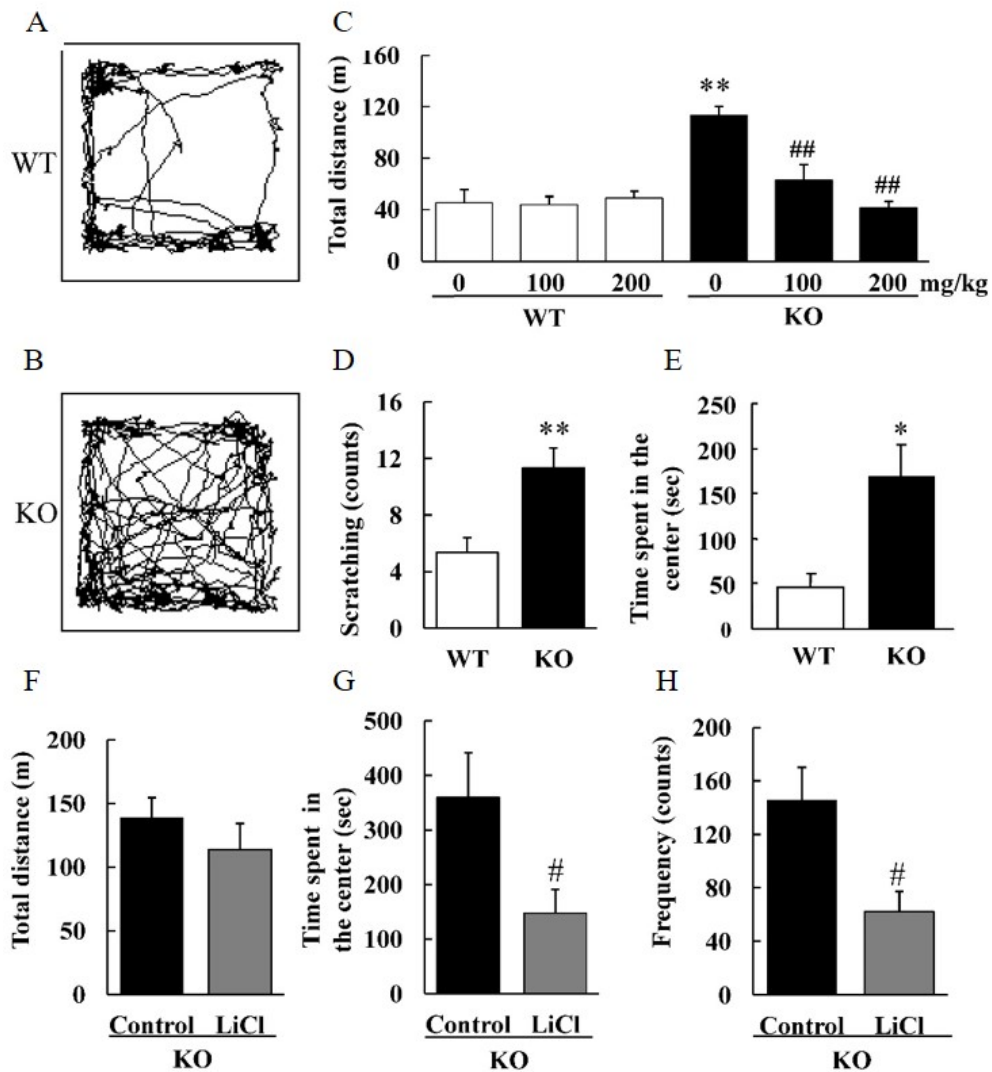
WT (n=10) and DGK $\beta$  KO (n=9) mice were placed in individual home cages, and their locomotion was assessed every hour for 24 hr. (A) Locomotor activity throughout the 24-hr period and (B) locomotor activity was analyzed separately during the day and night. \* ; p<0.05, \*\* ; p<0.01 vs. WT mice.

次に新奇環境下の活動性を評価する目的で、オープンフィールド試験を実施した。新奇環境下において、DGK $\beta$  欠損マウスは活動量の指標である総移動距離および常同行動の一つであるひっかき行動 (scratching)数が有意に増加していた (Fig. 20A-D)。双極性障害の治療薬である塩化リチウムの単回投与によって、総移動距離は野生型と同等程度まで改善した (Fig. 20C)。オープンフィールド試験

における DGK $\beta$  欠損マウスの総移動距離の増加は、マウスの精神行動に影響を及ぼす薬剤である抗精神病薬のハロペリドール、抗不安薬のジアゼパムおよび抗うつ薬のイミプラミンによって改善しなかった(データ未提示)。

### 3-2 DGK $\beta$ 欠損マウスの不安状態の評価およびリチウムの効果

オープンフィールド試験において活動量と共に、不安状態の指標である中心部滞在時間を測定した。DGK $\beta$  欠損マウスは野生型マウスと比較し装置の中心部滞在時間が有意に増加しており、不安指標が低下していることが示唆された(Fig. 20E)。活動量に影響を及ぼさない程度の、低用量の塩化リチウムを慢性投与することによって、DGK $\beta$  欠損マウスで認められた不安指標の低下は有意に改善した(Fig. 20F-H)。

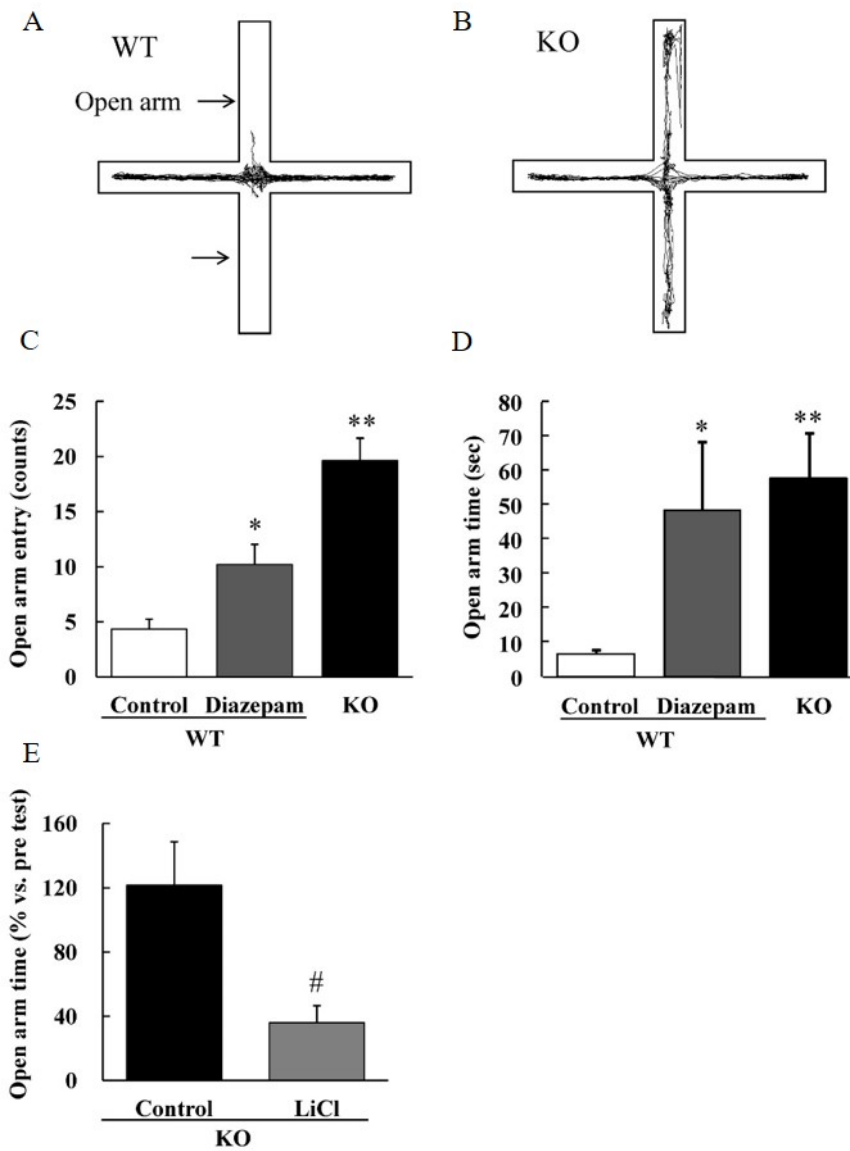


**Fig. 20. Open field test of WT and DGK $\beta$  KO mice.**

(A–E) Assessment of the single-dose lithium effect on DGK $\beta$  KO mice in the open field test. Representative images show typical examples of WT (A) and DGK $\beta$  KO (B) mice exploring behavior in the open field test. After drug treatment, each group of mice was placed in the open field apparatus and their distance traveled (C), number of scratching behaviors (D) and time spent in the center area (E) were measured. (n=5 to 9) \*\* ; p<0.01 vs. WT mice. ## ; p<0.01 vs. vehicle control. (F–H) Assessment of the chronic lithium effect on DGK $\beta$  KO mice in the open field test. After 10-days of drug treatment, mice were subjected to the open field test, and distance traveled (F), time spent in the center area (G) and the frequency of entering the center area (H) were measured for one hour. (n=6 or 7) # ; p<0.05 vs.



DGK $\beta$  欠損マウスの不安状態をより詳細に評価する目的で、高架式十字迷路試験を実施した。この試験において不安水準が低下したマウスはオープンアームへの侵入回数および滞在時間が増加することが知られている。実際に今回の実験条件においても野生型マウスに抗不安薬であるジアゼパムを投与することで、オープンアームへの侵入回数および滞在時間が増加することを確認した(Fig. 21C-D)。この試験においても、DGK $\beta$  欠損マウスは野生型マウスと比較して、有意にオープンアームへの侵入回数および滞在時間が増加しており、不安指標が低下していることが明らかになった(Fig. 21A-D)。高架式十字迷路試験におけるDGK $\beta$  欠損マウスの不安指標の低下も、塩化リチウムの慢性投与によって有意に改善した(Fig. 21E)。

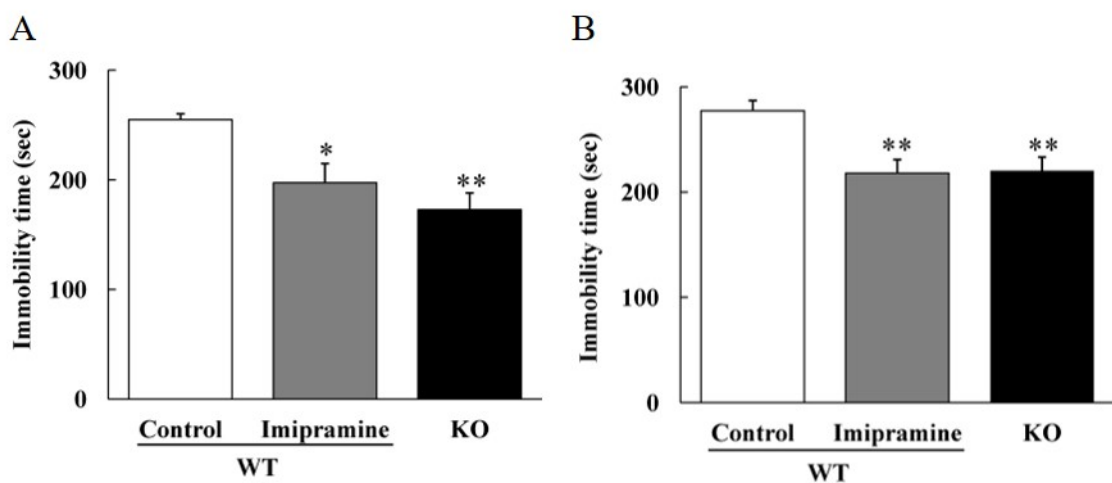


**Fig. 21. Elevated plus maze test of WT and DGK $\beta$  KO mice.**

Representative images show typical examples of WT (A) and DGK $\beta$  KO (B) mice exploring in the elevated plus maze apparatus. After drug treatment, each group of mice was placed in the elevated plus maze apparatus for 10 min, and the number of entries into (C) and the time spent in open arms (D) were assessed. (E) After 10-days of drug treatment, mice were subjected to the elevated plus maze test again, and their time spent in open arms as a ratio to the pre test was assessed. (n=7 to 9) \* ; p<0.05, \*\* ; p<0.01 vs. WT mice. # ; p<0.05 vs. control mice.

### 3-3 DGK $\beta$ 欠損マウスの抑うつ状態の評価

DGK $\beta$  欠損マウスの抑うつ状態を評価する目的で、強制水泳試験および尾懸垂試験を実施した。これらの試験における無動時間は、マウスの抑うつ状態の指標となることが知られている。また三環系やセロトニン選択的再取り込み阻害薬などの抗うつ薬を投与することで、無動時間が短縮するため、抗うつ薬開発のための評価系としても用いられている。実際に我々の試験においても野生型マウスに三環系抗うつ薬であるイミプラミンを投与することで、強制水泳試験および尾懸垂試験のいずれにおいても無動時間が低下することを確認した(Fig. 22)。本条件において、DGK $\beta$  欠損マウスの各試験における無動時間を測定したところ、いずれの試験においても、野生型マウスと比較して有意な無動時間の短縮が認められ、抑うつ指標が低下していることが確認できた(Fig. 22)。

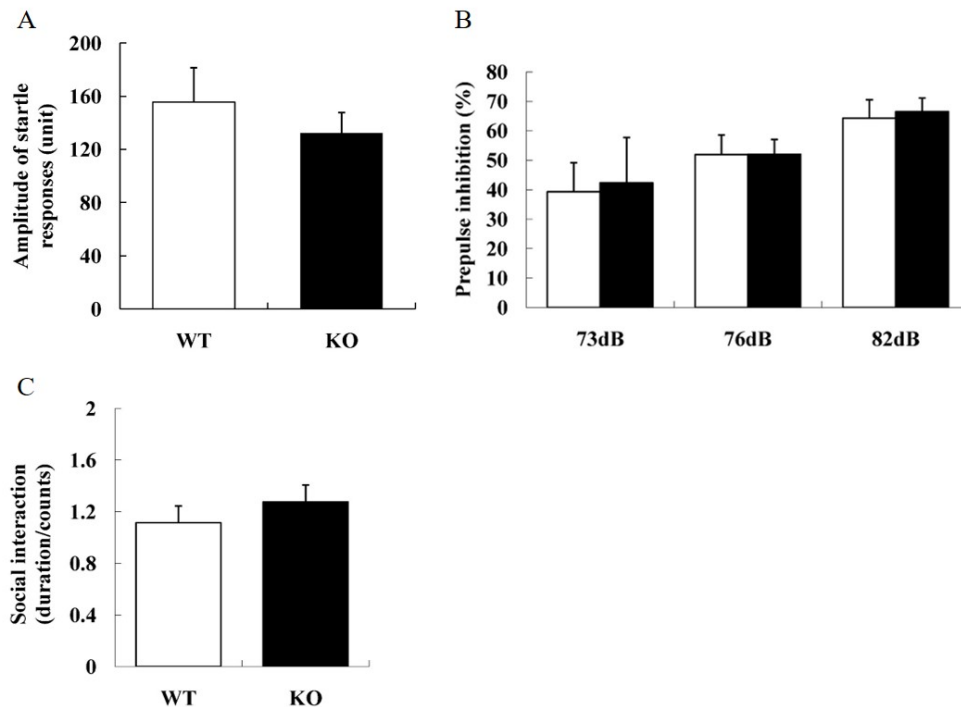


**Fig. 22. Antidepressant-like behaviors of DGK $\beta$  KO mice.**

(A) Immobile time of forced swim test. Thirty-minutes after drug treatment, mice were placed in water for a period of 6 min; only the last 5 min immobility time was measured. (B) Immobile time of tail suspension test. Thirty-minutes after drug treatment, mice were tail suspended with an adhesive tape 50 cm above the floor over a period of 7 min; immobility time was measured in only the last 6 min. (n=7 to 9) \*; p<0.05, \*\*; p<0.01 vs. WT mice.

### 3-4 DGK $\beta$ 欠損マウスの統合失調症様行動の検討

DGK $\beta$  の欠損が動物の行動に及ぼす影響をより詳細に評価するため、PPI 試験および社会性行動試験を実施した。PPI 試験は統合失調症の認知記憶障害を反映した行動異常であると考えられている。DGK $\beta$  欠損マウスは PPI 試験において、正常な驚愕反応および正常な PPI の程度を示した(Fig. 23A, B)。社会性行動試験は統合失調症の陰性症状を表現した行動試験として知られている。DGK $\beta$  欠損マウスの社会性行動は野生型マウスと同程度であり、社会性行動の異常は認められなかった(Fig. 23C)。

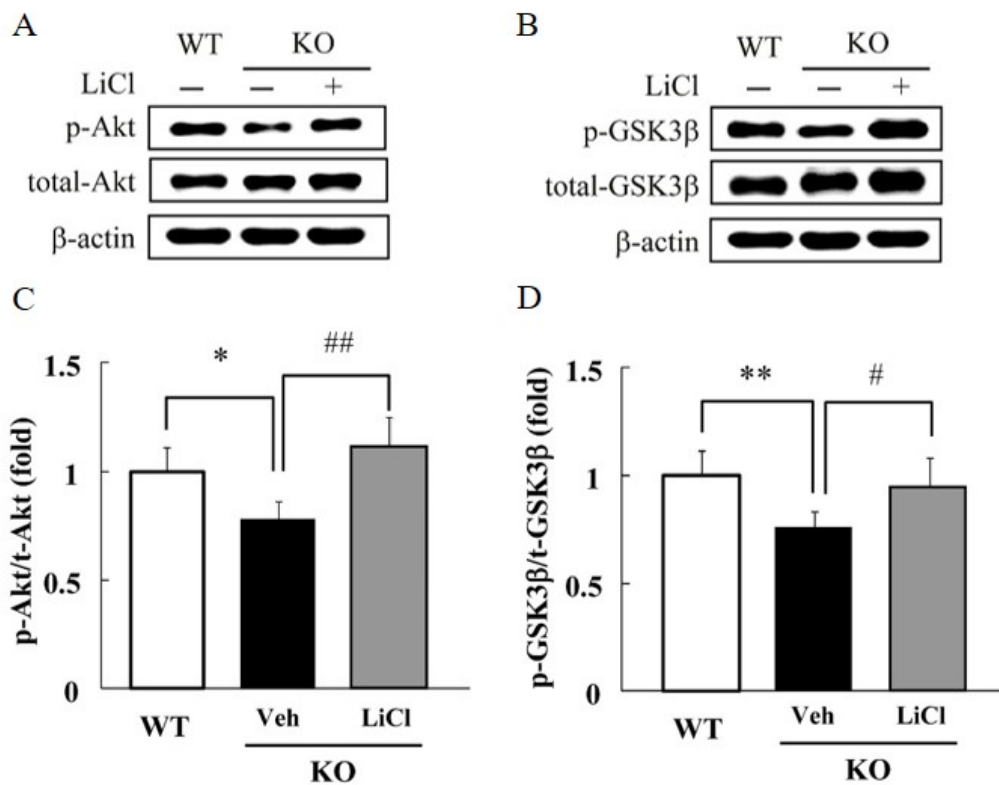


**Fig. 23. Prepulse inhibition and social interaction tests in DGK $\beta$  KO mice.**

(A, B) PPI of acoustic startle response in WT (n=7) and KO mice (n=9). (A) In the 120 dB-pulse-only trials, startle amplitude did not differ significantly between DGK $\beta$  KO and WT mice. (B) The PPI is expressed as a percentage of the startle response to a 120 dB-pulse. DGK $\beta$  KO mice showed normal PPI at each prepulse intensity. (C) Social interaction test in a novel environment in WT (n=8) and KO (n=8) mice. Two genetically identical mice that had been housed separately were placed in the same cage. Their social interaction was then monitored for 10 min. There was no significant difference in duration per contact between WT and DGK $\beta$  KO mice.

### 3-5 リチウム投与後のタンパク質リン酸化レベルの評価

ウェスタンブロット法を用いて、DGK $\beta$  が関与する経路の下流シグナルである Akt および GSK3 $\beta$  のリン酸化の程度を検討した。これらのタンパク質のリン酸化の程度はリチウムの作用機序の一つとしても知られている。DGK $\beta$  欠損マウスの皮質において、Akt および GSK3 $\beta$  の総発現量に対するリン酸化 Akt(Ser473)およびリン酸化 GSK3 $\beta$  の割合が有意に低下していた(Fig. 24)。DGK $\beta$  欠損マウスにおけるこれらのタンパク質のリン酸化レベルの低下は、塩化リチウムの慢性投与によって有意に改善した(Fig. 24)。塩化リチウムの投与は、野生型マウスの皮質 Akt および GSK3 $\beta$  のリン酸化レベルに影響を及ぼさなかった(データ未提示)。DGK $\beta$  欠損マウスの海馬および線条体において、これらのリン酸化レベルに変動は認められなかった(データ未提示)。



**Fig. 24. Western blot analysis of Akt-GSK3β signaling.**

(A, B) Phosphorylated Akt (Ser473) and GSK3β were decreased in the cortex of control group of DGKβ KO mice. (C, D) Quantitative analysis of Western blotting showed that phosphorylated Akt (Ser473) and GSK3β were decreased in the cortex of DGKβ KO mice, and that lithium treatment attenuated this effect. (n=7) \* ; p<0.05, \*\* ; p<0.01 vs. WT mice. # ; p<0.05, ## ; p<0.01 vs. vehicle control mice.

#### 第4節 考察

双極性障害はスパイン異常が認められる精神疾患で、その患者の一部では DGKβ の異常なスプライスバリエントが検出されている (Caricasole et al., 2002)。同様にスパインの異常を示す DGKβ 欠損マウスが双極性障害と類似した表現型を示す可能性を評価する目的で、各種行動実験を実施した。その結果 DGKβ 欠損マウスはホームケージ内あるいは新奇環境下で多動性を示すことが明らかとなった。このような多動性は双極性障害の躁状態や注意欠陥多動性障害 (attention

deficit hyperactivity disorder: ADHD)あるいは統合失調症の陽性症状のマウスモデルでも認められている (Beaulieu et al., 2006; Roybal et al., 2007; Oyagi et al., 2009)。また DGK $\beta$  欠損マウスの、新奇環境下での活動量の亢進は、塩化リチウムの 100 mg/kg 以上の単回投与によって有意に改善している。この用量の塩化リチウムの単回投与は、マウスにおいて毒性を示さないことが報告されており (Phiel et al., 2003)、実際に今回の研究においても、野生型マウスの活動量に影響を及ぼしていない。またマウスの精神行動に影響するハロペリドール、ジアゼパムあるいはイミプラミンの投与によって、DGK $\beta$  欠損マウスの活動量は改善しなかった。これらの結果は、DGK $\beta$  欠損マウスで認められている活動量の亢進が、リチウム感受性であることを示し、躁病のモデルマウスの特徴とよく合致する (Roybal et al., 2007)。DGK $\beta$  欠損マウスは、常同行動の一つである Scratching 数が有意に増加していた。Scratching 数の増加は、精神刺激薬の投与や統合失調症のモデルマウスでも認められている (Costall et al., 1977; Nagai et al., 2003)。著者らは別な報告において、DGK $\beta$  欠損マウスが ADHD 様の注意力欠損を示し、ドパミントランスポーター阻害薬で精神刺激作用のあるメチルフェニデートに対する感受性が著しく低下していることを示している (Ishisaka et al., 2012)。これらの結果は、DGK $\beta$  の欠損がドパミン受容体経路に作用することで、活動量の亢進などの症状を引き起こしていることを示唆している。

DGK $\beta$  欠損マウスは、同様に不安の低下を示唆する行動異常を示した。すなわち、オープンフィールド試験における装置の中央部や、高架式十字迷路試験におけるオープンアームへの滞在時間が有意に増加している。この不安指標の低下は、低濃度の塩化リチウム (600 mg/L) を飲水により慢性投与することで改善した。この条件の塩化リチウム投与は、DGK $\beta$  欠損マウスの活動量に影響を及ぼさなかった。この結果は、塩化リチウムによる不安指標の改善が急性投与で認められ

るような活動量の低下によって引き起こされた偽陽性の結果でないことを示している。Roybal らの報告によると、この濃度のリチウム投与によって、血漿中の  $\text{Li}^+$ 濃度は約 0.41 mmol/L になることが示されている (Roybal et al., 2007)。この濃度は躁病患者の維持期における血中  $\text{Li}^+$ 濃度と同程度である (Gelenberg et al., 1989)。この結果は、 $\text{DGK}\beta$  欠損マウスが臨床的に有効なリチウムの用量において躁状態の症状の一つである不安の低下が改善することを示している。この様に臨床で有用な薬物が、適切な濃度において作用することは、躁病治療薬開発のための動物モデルとして優れた特徴であるといえる。著者らは別な研究において、 $\text{DGK}\beta$  欠損マウスの過活動および不安レベルの低下が双極性障害治療薬であるオランザピンやバルプロ酸の慢性投与で改善することを示している (Ishisaka et al., 2015)。この様に臨床で有効性を示す複数の薬剤が作用することも、 $\text{DGK}\beta$  欠損マウスの躁病モデルとしての有用性を支持すると考えられる。

強制水泳試験および尾懸垂試験にいずれにおいても、 $\text{DGK}\beta$  欠損マウスは、試験中の無動時間が低下していた。これらの試験における無動時間の長さは、マウスの抑うつ症状と相関するといわれており、今回の結果は  $\text{DGK}\beta$  欠損マウスがうつとは相反する状態にあることを示している。一方、PPI の障害や社会性行動の低下等の統合失調症様の行動に関して、 $\text{DGK}\beta$  欠損マウスは正常な行動様式を示した。これらの結果より、 $\text{DGK}\beta$  欠損マウスは臨床用量の躁病治療薬で改善すること並びに躁状態あるいは ADHD 病態に類似した行動異常を示す特徴を有することが示唆された。

$\text{DGK}\beta$  欠損マウスにおける躁病様の行動異常とそれに及ぼす塩化リチウムの作用機序を検討する目的で、Akt および  $\text{GSK3}\beta$  のリン酸化について検討した。これらのタンパク質シグナルは  $\text{DGK}$  が関与する PKC シグナルおよび PA シグナルの両方の下流に存在し、リン酸化された Akt は  $\text{GSK3}\beta$  をリン酸化すること



でその活性を抑制している (Beaulieu et al., 2004)。またこれらのタンパク質のリン酸化はリチウムによって亢進することが報告されており、リチウムの作用機序の一つであると考えられている (Beaulieu et al., 2004)。DGK $\beta$  欠損マウスは、皮質において Akt(Ser473)および GSK3 $\beta$  のリン酸化レベルが低下しており、それらは塩化リチウム投与によって改善した。この様なりチウムによる Akt および GSK3 $\beta$  のリン酸化レベルの上昇は、同じく躁病モデルマウスとして報告されているドパミントランスポーター欠損マウスの線条体でも認められている (Beaulieu et al., 2004)。GSK3 $\beta$  に関しては、過剰発現させたトランスジェニックマウスおよびヘテロ欠損マウスのいずれもリチウム感受性の行動異常を示し、リチウムの作用機序の一旦に GSK3 $\beta$  が深くかかわっていることを示唆している (Prickaerts et al., 2006; Gould et al., 2007; Beaulieu et al., 2008)。DGK $\beta$  欠損マウスの行動異常およびそのリチウムによる改善作用の作用機序に関しては更なる研究が必要であるが、Akt および GSK3 $\beta$  を介したシグナルがその一部に関与していると考えられる。

## 総括および結論

Diacylglycerol kinase (DGK) $\beta$  とは diacylglycerol (DG)を phosphatidic acid (PA)に変換する酵素であり、皮質、海馬そして線条体などで高発現している。Gq タンパク質共役型受容体の脂質シグナリングを調節することで多様な生理作用を示す。一部の双極性障害患者において、DGK $\beta$  の C 末端側が欠損したスプライスバリエントが確認されており、DGK $\beta$  の疾患との関わりも示唆されている。

双極性障害は躁状態と抑うつ状態を繰り返す精神疾患であり、その発症には複数の遺伝子と、環境要因が複雑に関与している。双極性障害は難治性の場合が多く、生涯にわたる治療薬の摂取が必要となるが、十分な治療薬は存在しない。近年では大脳皮質におけるスパイン密度の低下が報告されており、病態との関連が注目されている。

本研究では DGK $\beta$  欠損マウスを作製しその表現型を解析することで、DGK $\beta$  のスパイン形成に対する作用を評価した。また long-term potentiation (LTP)の測定などの電気生理学的解析および認知記憶能力や双極性障害と関連のある行動解析を実施することで、DGK $\beta$  の欠損が高次脳機能に及ぼす影響や双極性障害との関連を検討した。

第1章では、DGK $\beta$  欠損マウスを作製し、そのスパイン構造を解析した。また *in vitro* において DGK $\beta$  の増減が、神経の発達にどの様に影響を及ぼすかを検討した。

- 1) *Sleeping Beauty* トランスポゾンシステムを用いて DGK $\beta$  欠損マウスを作製した。
- 2) DGK $\beta$  欠損マウスの皮質、海馬および線条体において、スパイン数の減少が認められた。

- 3) DGK $\beta$  欠損マウスの海馬由来の初代培養細胞において、突起の分岐数およびスパイン数が減少していた。その減少は DGK $\beta$  の強制発現で回復した。
- 4) DGK $\beta$  欠損マウスの線条体において、G $\alpha$ q/11 と TARP  $\gamma$ 8 の発現が低下していた。また DGK $\beta$  は触媒領域を含む C 末側の領域において、GluA2 と相互作用していた。

第 2 章では、DGK $\beta$  欠損マウスの認知機能を評価する目的で、海馬 CA1 領域における LTP を測定した。また学習記憶行動を評価し、メマンチン投与による影響を評価した。

- 1) DGK $\beta$  欠損マウスは、海馬 CA1 領域における LTP が低下していた。
- 2) DGK $\beta$  欠損マウスは、行動試験において作業記憶および空間参照記憶が低下していた。
- 3) DGK $\beta$  欠損マウスの作業記憶の低下は、メマンチンの単回投与によって改善した。

第 3 章では、DGK $\beta$  欠損マウスと精神疾患との関連を評価する目的で、活動量、不安および抑うつ状態を評価した。また双極性障害治療薬であるリチウムがその行動に及ぼす影響を評価した。

- 1) DGK $\beta$  欠損マウスは、ホームケージおよび新奇環境下において過活動を示した。新奇環境下における過活動は塩化リチウムの単回投与によって改善した。
- 2) DGK $\beta$  欠損マウスは、不安の低下を示す行動異常を呈した。この不安の低下は塩化リチウムの慢性投与によって改善した。
- 3) DGK $\beta$  欠損マウスは、野生型マウスと比較して抑うつ指標が低下していた。
- 4) DGK $\beta$  欠損マウスの皮質において Akt および GSK3 $\beta$  のリン酸化量が低下して

いた。またリチウム投与はこれらのリン酸化量を増加させた。

本研究において DGK $\beta$  欠損マウスを作製し、そのスパイン状態を評価することで、DGK $\beta$  の発現が皮質、海馬および線条体のスパイン形成に重要な役割を示すことを明らかにした。またスパインの減少は DGK $\beta$  欠損マウスの LTP や学習記憶行動に影響を及ぼしており、メマンチンは NMDA 受容体 NR2 サブユニットの機能を調節することで、作業記憶の低下を改善している可能性を示した。DGK $\beta$  欠損マウスは、双極性障害の特に躁病態と類似した行動異常を示し、双極性障害治療薬であるリチウムは Akt および GSK3 $\beta$  の経路を介して、一部の行動を改善するなど、躁病態のモデルマウスとして有用な特徴を有していた。

以上、DGK $\beta$  はスパイン形成に必須のタンパク質であり、認知機能制御や感情機能制御等の高次脳機能に重要な役割を示していることを明らかにした。さらに DGK $\beta$  欠損マウスは双極性障害をはじめとした、スパインの異常を病態生理として持つ複数の疾患のスクリーニングに用いることができる良い疾患モデルとなる可能性を示した。今後 DGK $\beta$  欠損マウスを用いることで、DGK $\beta$  の脳内における役割の詳細な検討および双極性障害や注意欠陥多動性障害等の複数の疾患にまたがる治療薬の開発への貢献が期待できる。

## 謝 辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御指導ならびに御助言を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士に深謝いたします。また、諸種の御協力を頂きました薬効解析学研究室研究室諸氏に心から感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なる御助言を賜りました岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室教授 稲垣直樹博士、岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物動態学研究室教授 北市清幸博士並びに岐阜薬科大学生体機能解析学大講座分子生物学研究室准教授 塩田倫史博士に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、実験材料の御提供、御助言並びに御協力を賜りました神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻教授 白井康仁博士、神戸大学バイオシグナル研究センター神経情報伝達分野教授 齋藤尚亮博士、山形大学医学部解剖学第二講座教授 後藤薫博士、秋田大学大学院医学系研究科細胞生物学講座教授 八月朔日泰和博士、大阪大学大学院医学系研究科環境・生体機能学講座教授 竹田潤二博士、奈良県立医科大学・生理学第二講座 教授 堀江恭二博士、東北大学大学院薬学研究科薬理学分野教授 福永浩司博士および講師 森口茂樹博士、カルナバイオサイエンス株式会社(現、株式会社ジェノミックス) 横田耕一博士に心から感謝の意を表します。

## 引用文献

Adachi N., Oyasu M., Taniguchi T., Yamaguchi Y., Takenaka R., Shirai Y., Saito N. 2005. Immunocytochemical localization of a neuron-specific diacylglycerol kinase beta and gamma in the developing rat brain. *Brain research Molecular brain research* 139, 288-299.

Bannerman D.M., Niewoehner B., Lyon L., Romberg C., Schmitt W.B., Taylor A., Sanderson D.J., Cottam J., Sprengel R., Seeburg P.H. 2008. NMDA receptor subunit NR2A is required for rapidly acquired spatial working memory but not incremental spatial reference memory. *Journal of Neuroscience* 28, 3623-3630.

Barnes C.A., Danysz W., Parsons C.G. 1996. Effects of the Uncompetitive NMDA Receptor Antagonist Memantine on Hippocampal Long - term Potentiation, Short - term Exploratory Modulation and Spatial Memory in Awake, Freely Moving Rats. *European Journal of Neuroscience* 8, 565-571.

Beaulieu J.-M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. 2006. Paradoxical striatal cellular signaling responses to psychostimulants in hyperactive mice. *Journal of Biological Chemistry* 281, 32072-32080.

Beaulieu J.-M., Sotnikova T.D., Yao W.-D., Kockeritz L., Woodgett J.R., Gainetdinov R.R., Caron M.G. 2004. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5099-5104.

Beaulieu J.M., Marion S., Rodriguiz R.M., Medvedev I.O., Sotnikova T.D., Ghisi V., Wetsel W.C., Lefkowitz R.J., Gainetdinov R.R., Caron M.G. 2008. A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* 132, 125-136.

Caricasole A., Bettini E., Sala C., Roncarati R., Kobayashi N., Caldara F., Goto K., Terstappen G.C. 2002. Molecular cloning and characterization of the human diacylglycerol kinase beta (DGKbeta) gene: alternative splicing generates DGKbeta isoforms with different properties. *The Journal of biological chemistry* 277, 4790-4796.

Chibalin A.V., Leng Y., Vieira E., Krook A., Bjornholm M., Long Y.C., Kotova O., Zhong Z., Sakane F., Steiler T., Nylen C., Wang J., Laakso M., Topham M.K., Gilbert M., Wallberg-Henriksson H., Zierath J.R. 2008. Downregulation of diacylglycerol kinase

delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance. *Cell* 132, 375-386.

Chung W., Choi S.Y., Lee E., Park H., Kang J., Park H., Choi Y., Lee D., Park S.G., Kim R., Cho Y.S., Choi J., Kim M.H., Lee J.W., Lee S., Rhim I., Jung M.W., Kim D., Bae Y.C., Kim E. 2015. Social deficits in IRSp53 mutant mice improved by NMDAR and mGluR5 suppression. *Nat Neurosci* 18, 435-443.

Costall B., Marsden C.D., Naylor R.J., Pycock C.J. 1977. Stereotyped behaviour patterns and hyperactivity induced by amphetamine and apomorphine after discrete 6-hydroxydopamine lesions of extrapyramidal and mesolimbic nuclei. *Brain Research* 123, 89-111.

Ebert D.H., Greenberg M.E. 2013. Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature* 493, 327-337.

Elston G.N., Oga T., Fujita I. 2009. Spinogenesis and pruning scales across functional hierarchies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 3271-3275.

Fiala J.C., Spacek J., Harris K.M. 2002. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain research Brain research reviews* 39, 29-54.

Fukaya M., Tsujita M., Yamazaki M., Kushiya E., Abe M., Akashi K., Natsume R., Kano M., Kamiya H., Watanabe M. 2006. Abundant distribution of TARP  $\gamma$  - 8 in synaptic and extrasynaptic surface of hippocampal neurons and its major role in AMPA receptor expression on spines and dendrites. *European Journal of Neuroscience* 24, 2177-2190.

Galvez R., Greenough W.T. 2005. Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 135, 155-160.

Gelenberg A.J., Kane J.M., Keller M.B., Lavori P., Rosenbaum J.F., Cole K., Lavelle J. 1989. Comparison of standard and low serum levels of lithium for maintenance treatment of bipolar disorder. *The New England journal of medicine* 321, 1489-1493.

Ghosh S., Strum J.C., Sciorra V.A., Daniel L., Bell R.M. 1996. Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 8472-8480.

- Glausier J.R., Lewis D.A. 2013. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 251, 90-107.
- Goto K., Hozumi Y., Nakano T., Saino S.S., Kondo H. 2007. Cell biology and pathophysiology of the diacylglycerol kinase family: morphological aspects in tissues and organs. *International review of cytology* 264, 25-63.
- Goto K., Kondo H. 1993. Molecular cloning and expression of a 90-kDa diacylglycerol kinase that predominantly localizes in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7598-7602.
- Gould T.D., Einat H., O'Donnell K.C., Picchini A.M., Schloesser R.J., Manji H.K. 2007. Beta-catenin overexpression in the mouse brain phenocopies lithium-sensitive behaviors. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32, 2173-2183.
- Green M.F. 2006. Cognitive impairment and functional outcome in schizophrenia and bipolar disorder. *The Journal of clinical psychiatry* 67, 3-8.
- Horie K., Yusa K., Yae K., Odajima J., Fischer S.E., Keng V.W., Hayakawa T., Mizuno S., Kondoh G., Ijiri T. 2003. Characterization of Sleeping Beauty transposition and its application to genetic screening in mice. *Molecular and cellular biology* 23, 9189-9207.
- Hozumi Y., Fukaya M., Adachi N., Saito N., Otani K., Kondo H., Watanabe M., Goto K. 2008. Diacylglycerol kinase  $\beta$  accumulates on the perisynaptic site of medium spiny neurons in the striatum. *European Journal of Neuroscience* 28, 2409-2422.
- Hozumi Y., Watanabe M., Otani K., Goto K. 2009. Diacylglycerol kinase  $\beta$  promotes dendritic outgrowth and spine maturation in developing hippocampal neurons. *BMC neuroscience* 10, 99.
- Irwin S.A., Galvez R., Greenough W.T. 2000. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cerebral cortex* 10, 1038-1044.
- Ishisaka M., Kakefuda K., Oyagi A., Ono Y., Tsuruma K., Shimazawa M., Kitaichi K., Hara H. 2012. Diacylglycerol kinase  $\beta$  knockout mice exhibit attention-deficit behavior and an abnormal response on methylphenidate-induced hyperactivity. *PLoS One* 7, e37058.



Ishisaka M., Tsujii S., Mizoguchi T., Tsuruma K., Shimazawa M., Hara H. 2015. The effects of valproate and olanzapine on the abnormal behavior of diacylglycerol kinase  $\beta$  knockout mice. *Pharmacological Reports* 67, 275-280.

Kim K., Yang J., Zhong X.P., Kim M.H., Kim Y.S., Lee H.W., Han S., Choi J., Han K., Seo J. 2009a. Synaptic removal of diacylglycerol by DGK  $\zeta$  and PSD-95 regulates dendritic spine maintenance. *The EMBO Journal* 28, 1170-1179.

Kim K., Yang J., Zhong X.P., Kim M.H., Kim Y.S., Lee H.W., Han S., Choi J., Han K., Seo J., Prescott S.M., Topham M.K., Bae Y.C., Koretzky G., Choi S.Y., Kim E. 2009b. Synaptic removal of diacylglycerol by DGKzeta and PSD-95 regulates dendritic spine maintenance. *Embo j* 28, 1170-1179.

Konopaske G.T., Lange N., Coyle J.T., Benes F.M. 2014. Prefrontal cortical dendritic spine pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *JAMA psychiatry* 71, 1323-1331.

Lamprecht R., LeDoux J. 2004. Structural plasticity and memory. *Nature reviews Neuroscience* 5, 45-54.

Malinow R., Malenka R.C. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience* 25, 103-126.

Medvedev N.I., Rodríguez - Arellano J.J., Popov V.I., Davies H.A., Tigaret C.M., Schoepfer R., Stewart M.G. 2008. The glutamate receptor 2 subunit controls post-synaptic density complexity and spine shape in the dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience* 27, 315-325.

Minkeviciene R., Banerjee P., Tanila H. 2004. Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311, 677-682.

Multani P., Myers R., Blume H., Schomer D., Sotrel A. 1994. Neocortical dendritic pathology in human partial epilepsy: a quantitative Golgi study. *Epilepsia* 35, 728-736.

Nagai T., Noda Y., Une T., Furukawa K., Furukawa H., Kan Q., Nabeshima T. 2003. Effect of AD-5423 on animal models of schizophrenia: phencyclidine-induced behavioral changes in mice. *Neuroreport* 14, 269-272.

Owczarek S., Hou J., Secher T., Kristiansen L.V. 2011. Phencyclidine treatment increases

NR2A and NR2B N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in rats. *Neuroreport* 22, 935-938.

Oyagi A., Oida Y., Kakefuda K., Shimazawa M., Shioda N., Moriguchi S., Kitaichi K., Nanba D., Yamaguchi K., Furuta Y. 2009. Generation and characterization of conditional heparin-binding EGF-like growth factor knockout mice. *PLoS One* 4, e7461.

Peça J., Feliciano C., Ting J.T., Wang W., Wells M.F., Venkatraman T.N., Lascola C.D., Fu Z., Feng G. 2011. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472, 437-442.

Phiel C.J., Wilson C.A., Lee V.M., Klein P.S. 2003. GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423, 435-439.

Prickaerts J., Moechars D., Cryns K., Lenaerts I., van Craenendonck H., Goris I., Daneels G., Bouwknecht J.A., Steckler T. 2006. Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3 $\beta$ : a putative model of hyperactivity and mania. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 9022-9029.

Roy D.S., Arons A., Mitchell T.I., Pignatelli M., Ryan T.J., Tonegawa S. 2016. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature* 531, 508-512.

Roybal K., Theobald D., Graham A., DiNieri J.A., Russo S.J., Krishnan V., Chakravarty S., Peevey J., Oehrlein N., Birnbaum S. 2007. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 6406-6411.

Sakane F., Imai S., Kai M., Yasuda S., Kanoh H. 2007. Diacylglycerol kinases: why so many of them? *Biochimica et biophysica acta* 1771, 793-806.

Sakimura K., Kutsuwada T., Ito I., Manabe T. 1995. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon1 subunit. *Nature* 373, 151.

Shi Y., Lu W., Milstein A.D., Nicoll R.A. 2009. The stoichiometry of AMPA receptors and TARPs varies by neuronal cell type. *Neuron* 62, 633-640.

Tang Y.-P., Shimizu E., Dube G.R., Rampon C., Kerchner G.A., Zhuo M., Liu G., Tsien J.Z. 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401, 63-69.

Topham M.K. 2006. Signaling roles of diacylglycerol kinases. *Journal of cellular*

biochemistry 97, 474-484.

Topham M.K., Prescott S.M. 1999. Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *The Journal of biological chemistry* 274, 11447-11450.

Topham M.K., Prescott S.M. 2001. Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism. *The Journal of cell biology* 152, 1135-1143.

Tsai J., Grutzendler J., Duff K., Gan W.-B. 2004. Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nature neuroscience* 7, 1181-1183.

Usuki T., Takato T., Lu Q., Sakai H., Bando K., Kiyonari H., Sakane F. 2016. Behavioral and pharmacological phenotypes of brain-specific diacylglycerol kinase delta-knockout mice. *Brain Res* 1648, 193-201.

von Engelhardt J., Doganci B., Jensen V., Hvalby Ø., Göngrich C., Taylor A., Barkus C., Sanderson D.J., Rawlins J.N.P., Seeburg P.H. 2008. Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron* 60, 846-860.

Wei H., Dobkin C., Sheikh A.M., Malik M., Brown W.T., Li X. 2012. The therapeutic effect of memantine through the stimulation of synapse formation and dendritic spine maturation in autism and fragile X syndrome. *PloS one* 7, e36981.

Yamada K., Komori Y., Tanaka T., Senzaki K., Nikai T., Sugihara H., Kameyama T., Nabeshima T. 1999. Brain dysfunction associated with an induction of nitric oxide synthase following an intracerebral injection of lipopolysaccharide in rats. *Neuroscience* 88, 281-294.

## 略語一覽表

ADHD	: attention deficit hyperactive disorder
AMPA	: $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
BDNF	: brain derived neurotrophic factor
DG	: diacylglycerol
DGK	: diacylglycerol kinase
EGFP	: enhanced green fluorescent protein
GDNF	: glial cell derived neurotrophic factor
GSK-3	: glycogen synthase kinase-3
KO	: knockout
LTD	: long-term depression
LTP	: long-term potentiation
MSNs	: medium spiny neurons
mTOR	: mammalian target of rapamycin
NMDA	: <i>N</i> -methyl-D-aspartate
nPCP	: neonatal phencyclidine
PA	: phosphatidic acid
PB	: phosphate buffer
PBS	: phosphate buffer saline
PFA	: paraformaldehyde
PIP <sub>2</sub>	: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	: protein kinase C
PLC	: phospholipase C
PPI	: prepulse inhibition

PSD-95 : postsynaptic density protein 95  
RasGRP : Ras guanyl nucleotide-releasing protein  
TARP : transmembrane AMPA receptor regulatory protein  
TBS : tris-buffered saline  
WT : wild type