

「第22回日本臨床環境医学会学術集会特集」

総説 奨励賞発表論文

Neuropathy target esterase (神経障害標的エステラーゼ)
遺伝子導入マウスの作製加賀谷 徹¹⁾ 割田 貴之²⁾ 三浦 浩美²⁾ 大塚 正人²⁾
大久保 朋一³⁾ 坂部 貢²⁾ 木村 穰²⁾

1) 東海大学大学院医学研究科

2) 東海大学医学部基礎医学系

3) 東海大学伊勢原研究推進部生命科学統合支援センター

Construction of transgenic mice harboring human
PNPLA6 gene encoding neuropathy target esteraseToru Kagaya¹⁾ Takayuki Warita²⁾ Hiromi Miura²⁾ Masato Ohtsuka²⁾
Tomoichi Ohkubo³⁾ Kou Sakabe²⁾ Minoru Kimura²⁾

1) Graduate School of Medicine, Tokai University

2) Division of Basic Medical Sciences and Molecular Medicine, School of Medicine, Tokai University

3) Education and Research Support Center, Tokai University

要約

我々はこれまでにシックハウス症候群の発症に関する遺伝子素因を検討してきたが、現在その候補として *PNPLA6* (Patatin-like phospholipase domain containing 6) 遺伝子に注目している。この遺伝子産物は神経障害標的エステラーゼ (Neuropathy Target Esterase:NTE) である。シックハウス症候群の原因物質と言われる有機リンの毒性はコリンエステラーゼ (ChE) の阻害作用による急性中毒の他に遅発性神経毒性 (OPIDN; Organophosphorus-induced Delayed Neurotoxicity) があり、これが NTE の阻害によるものであるといわれている。したがって、シックハウス症候群と OPIDN との関連性は興味深い。

これまで我々はシックハウス症候群の患者群では NTE 活性が高い傾向にあることに加え、線虫や鶏卵などの実験動物を使用した NTE 酵素活性量と有機リン曝露による生物学的影響について報告してきた。今回はヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウス作製に成功したので、その結果を報告する。

(臨床環境 23: 34-40, 2014)

《キーワード》シックハウス症候群、有機リン、Neuropathy Target Esterase、*PNPLA6* gene、遺伝子導入マウス

受付:平成26年9月19日 採用:平成26年9月22日

別刷請求宛先:木村 穰

〒259-1193 伊勢原市下糟屋143 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

Received: September 19, 2014 Accepted: September 22, 2014

Reprint Requests to Minoru Kimura, Department of Molecular Life Science, School of Medicine, Tokai University, 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

Abstract

Sick House Syndrome (SHS) or Sick Building Syndrome (SBS) is a set of several clinically recognizable symptoms without a clear cause thought to be brought on by exposure to volatile agents, such as formaldehyde and organophosphates(OPs). Neuropathy target esterase (NTE) is a membrane bound serine esterase, and its reaction with OPs can lead to OP-induced delayed neuropathy (OPIDN) and nerve axon degeneration. Our previous study showed that the enzymatic activity of NTE was significantly higher ($P < 0.0005$) in the patients compared with controls and the population with an AA genotype of single nucleotide polymorphism rs480208 within the *PNPLA6* gene, in intron 21 of the *PNPLA6* gene reduced the activity of NTE. In this study, we generated transgenic mice that highly expressed the *PNPLA6* gene, leading to a high activity of NTE. Using these mouse lines we expected to determine whether a high activity towards NTE corresponds to the high sensitivity for organophosphate exposure or not, and examine the mouse model for SHS or OPIDN. (Jpn J Clin Ecol 23 : 34 – 40, 2014)

《Key words》 sick building syndrome, organophosphate, neuropathy target esterase, *PNPLA6* gene, transgenic mouse

I. はじめに

シックハウス症候群は気密性の高い家で、建設の際に使用した揮発性の化学物質のホルムアルデヒド、トルエン、キシレンや有機リンが室内に存在することや農薬散布により、そこに住む人が1ヶ月間などの長期間の曝露を経て、倦怠感・めまい・頭痛・湿疹・のどの痛み・呼吸不全などの慢性的な症状が現れる疾患である。しかし、同一環境でも個人によって症状がでないこともあるため、遺伝要因があると想定される。

我々は有機リン代謝に関与する神経障害エステラーゼ (Neuropathy Target Estrase ; NTE)¹⁾ と、そのタンパクをコードする遺伝子の *PNPLA6* に絞って研究を行い、これまでにシックハウス症候群患者では NTE 酵素活性が高いことを発表してきた^{2,3)}。また鶏卵を使用した実験では、農薬に含まれる有機リン DDVP (ジクロロボス)⁴⁾ の投与により、アセチルコリンエステラーゼと同様の即時性の NTE 阻害効果が現れた事を報告した⁵⁾。

現在、新築の家屋では建材などに防虫等の目的で使用されるホルムアルデヒドとクロルピリフォス (図1) に規制値があるが、未だ農薬・殺虫剤に DDVP 等の有機リンは多用されている。

遺伝子多型マーカーを用いた遺伝子相関解析により、我々の研究グループはシックハウス症候群の疾患感受性遺伝子として神経障害標的エステラーゼ (NTE) をコードする *PNPLA6* (Patatin-like phospholipase domain containing 6) 遺伝子を同定

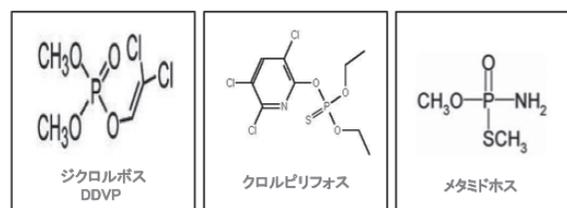


図1 種々の有機リン

することができた³⁾。ヒト *PNPLA6* 遺伝子は染色体19p13.2に存在する⁶⁾。一般的に、有機リンの毒性としてはコリンエステラーゼ (ChE) の阻害作用が有名であるが、そのほかに遅れて症状が出る遅発性神経毒 (Organophosphate-induced delayed neuropathy : OPIDN) があり、これが NTE の阻害によるものであるといわれ、シックハウス症候群のモデルとしても考えられている^{1,7,8)}。

NTE 欠損マウス (*PNPLA6* ノックアウトマウス) のホモ型では、胎児期8日頃に死亡し、NTE 活性の低いヘテロ (+/-) 型マウスでは出生はするが、正常なマウスと比較して多動性であることが報告されている^{6,9)}。また野生型マウスに NTE の阻害物質である ethyl octylphosphonofluoridate (EOPF) を少量投与した場合もまた多動性症状が顕著に認められる⁶⁾。以上のことから、遺伝子破壊または阻害剤投与による NTE 活性の低下が、神経毒性効果に影響を与えていることが明らかにされた。

また最近の NTE に関する知見では、NTE は膜

結合型の lysophospholipase であり¹⁰⁾、NTE 活性の中心であるセリン残基が有機リンと結合するとき¹¹⁾、さらに化学構造の変化が引き起こされ（アルキル基の除去）、これが遅発性神経毒を発現させるという報告がある¹⁾。

我々はいままで *PNPLA6* 遺伝子産物である NTE がシックハウス症候群の患者群で活性が高い傾向にあること³⁾、そして線虫や鶏卵などを用いた動物実験から NTE 活性が有機リン曝露により生物学的影響を受けることについて報告してきた⁵⁾。また有機リンの培養細胞に対する影響について、この遺伝子の一部を導入した培養細胞の NTE 活性の上昇を報告した（第22回日本臨床環境医学会学術集会）。

本研究では、NTE を通した有機リンの生物学的影響を更に理解するために、動物個体での影響を調べることを目的として、ヒト *PNPLA6* 遺伝子を導入したマウスを作製したので報告する。

このようなマウスを利用してシックハウス症候群や OPIDN の発症機構を解明していくことが最終目標である。

II. ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウスの作製

一般に遺伝子導入マウスを作製する場合は、マウス受精卵の融合前の精子に由来する核（前核という）に DNA を注入するが、注入した DNA はマウス染色体の一カ所にランダムに挿入される（図2）。つまり我々が挿入位置を決定することができない。その結果、導入した遺伝子の発現がまちまちで、せっかく導入した遺伝子が染色体の不活領域に挿入された結果、発現しない例も多々観察された。そこで、我々のグループは導入遺伝子が指定された位置に導入され、遺伝子発現が必ず約束される系を開発した¹²⁾。このシステムでは導入 DNA がマウスの第6染色体上にある ROSA26 という染色体活性化領域の遺伝子に挿入されるように予め ROSA26 遺伝子に細工が加えられている。Cre-loxP というもともと細菌が持っていた組換えの系をマウスでも働かせ、CRE という組換え酵素が ROSA26 上の loxP 配列（loxJT15 と lox2272）と導入ベクター上の loxP（loxJTZ17 と

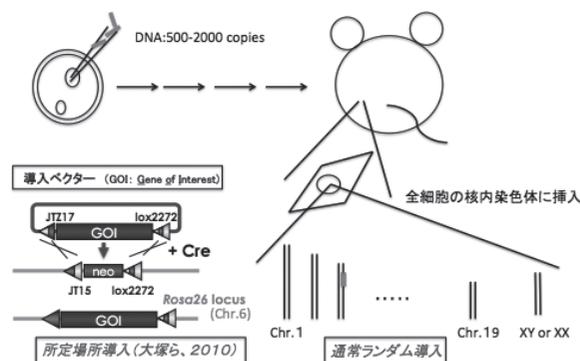


図2 ROSA26部位を利用したトランスジェニックマウスでの安定的遺伝子発現

lox2272) で組換えを起こさせるという方法である。

現在では CRE 酵素の供給は DNA からではなく、mRNA 注入（導入ベクター DNA との同時注入）による発現によっている¹²⁾。これまでにすでに多くの実績例があったが、今回の *PNPLA6* 遺伝子にも応用することとした。

話がやや複雑になるが、通常導入ベクターのベクター部分（大腸菌で大量に DNA を得るためのプラスミド DNA）も遺伝子導入マウスでは発現抑制に関わるものが多く、その部分を ROSA26 に遺伝子導入と同時に、除去するための FLPe-FRT システムを導入ベクターに組み込んでいたが、162 個の受精卵に injection を行い、出生仔を 20 匹得た。しかし、その中に *PNPLA6* 遺伝子を持つ個体は得られなかった。

その理由として、*PNPLA6* 遺伝子の発現には全身で強力に発現する CAG プロモーターを用いているため、このタンパク質が過剰に発現するとかって生存には不利な可能性が考えられた。

そこで上述の FLPe-FRT 配列を除いた BFH ベクターを構築し（図3）、上述の発現抑制領域を残したまま、ROSA26 部位に *PNPLA6* 遺伝子を導入し、一旦発現抑制をかけた遺伝子導入個体を得て、その後に FLPe-FRT システムで過剰発現を検討する系を考え、実施することにした。

その結果、384 個の受精卵に BFH DNA を導入し、38 匹が出産、そのうち hNTE1 ~ hNTE8 まで



図3 ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入ベクター

の計8個体(雌雄それぞれ4個体)が遺伝子導入個体として得られた(BFHマウス)。ベクター由来の発現抑制領域を排除させるためにヘテロ型BFHマウス(BFH +/-)とヘテロ型FLPeマウス(FLPe +/-)を交配し、BFH +/- FLPe +/-マウスの取得を目指した。FLPe組換え酵素もCAGプロモーターによって発現するマウスを用いているため、受精卵の時期にFLPeによって組換えを起こすことが期待される。このマウスではBFHマウスがもつFRTで挟まれたneo-発現抑制領域が切断排除されるので、Rosa26領域に存在するCAGプロモータ活性によりPNPLA6が発現し、さらにIRES配列が存在することによってこの転写産物に翻訳システムが再会合するので、緑色蛍光タンパク質(GFP)が全身で高発現することが期待される。

現在までの結果では、94個体中10匹;10.6%が目的の個体と言える。ただし、PCRによるDNA解析結果は、FLPeによって予想通り発現抑制部分が抜けている細胞と抜けきっていない細胞が同一個体のなかで混在するモザイク個体であることが判明した。子孫への伝達率の低さはそれを物語っているかもしれない。また一部の遺伝導入個体に成長の遅れが観察された。

Ⅲ. *PNPLA6* 遺伝子導入マウスにおける遺伝子発現

導入遺伝子は*PNPLA6*遺伝子の下流に一つのmRNAから複数種のタンパク質を発現させるためのIRES(Internal Ribosome Entry Site)配列を配置し、その下流にレポーター遺伝子、GFP(Green Fluorescent Protein)を配備した。GFPはもともとクラゲのタンパク質で自身が蛍光を発するため、上流の目的遺伝子発現の簡便な指標として広く用いられている(図4)

FLPeと交配後のマウスについてGFPの発現をチェックしたところ、図5示すような結果が得られた。写真は胎生18日目のマウスを示しているが、同様の手法はDNA解析に用いる際の耳片においても観察することができる。すなわち耳で蛍光を観察出来るマウスは*PNPLA6*の発現が行われていると推測出来る。

これらマウスのNTE活性測定のため、胎仔期から3週齢の段階で*PNPLA6*遺伝子導入マウスとWild-typeマウスから脳を採材し、脳内のNTE酵素活性について検討した(図6)。

その結果、対照であるWild-typeマウスのNTE活性と比較して、*PNPLA6*遺伝子発現マウスの脳ではNTE活性が6.5倍程度高くなっていることが認められた(図6)。

NTE活性の測定は常法にしたがっているが、paraoxon耐性でmipaflox感受性の活性をNTE活性としている^{3,6)}。

Ⅳ. 考察

本論文ではNTEをコードする*PNPAL6*遺伝子

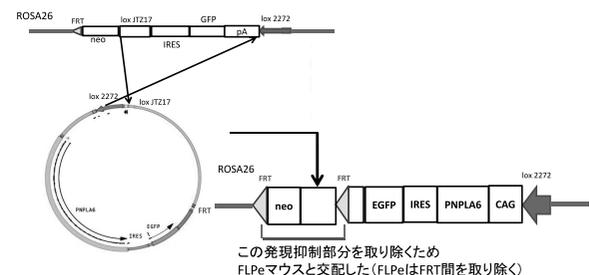


図4 ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウスの作製

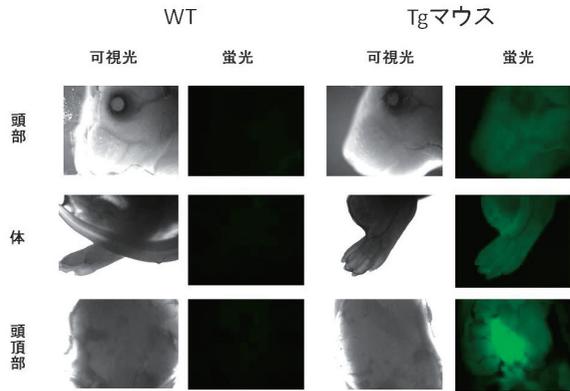


図5 遺伝子導入マウスでの蛍光発現 (胎生期18日目)

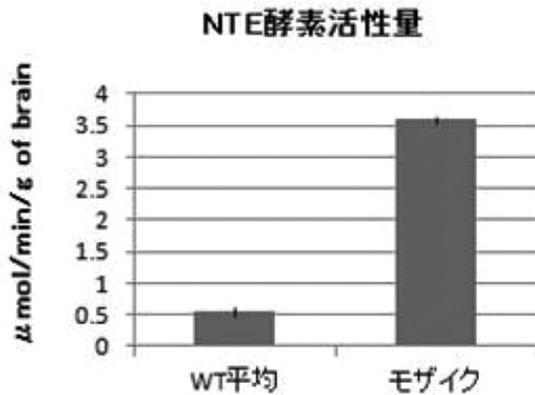


図6 遺伝子導入マウス (mosaic) 脳での NTE 酵素活性量 (3週齢)

導入マウスを用い、高発現マウスを作成出来たことを報告した。*PNPLA6* ベクターの GFP マーカー発現と共に、確かに NTE 酵素活性の高いマウスが得られたことから、我々の遺伝子導入マウス作製システムは有効に動いていると考えられる¹²⁾。

マウスにおいて高発現させた場合には、調べる限りすべてがモザイク個体であり、成長の遅い個体も現れた。高発現の影響が個体にとって不利な状況となることが考えられ、その原因として臓器別の発現量の差も追究して行かなくてはならない。

このことは *PNPLA6* の過剰発現が個体維持にとって不利かもしれないと推測させるが、腎臓由来の 293 細胞と我々のベクター¹³⁾ を使用する限り、

高発現のさしたる悪影響は観察されていない (未発表)。現在は主に脳での影響に注意しているが、個体での解析においては各臓器での発現比較も含めた総合的な判断が必要と思われる。

Winrow らはノックアウトマウスを作成し、胎生期 9 日目ぐらいで胎児は死亡するとしている⁶⁾。これはその後に胎盤の血管形成の影響と判明したが⁹⁾、それでもこの *PNPLA6* 遺伝子が生物種を超えて保存され、植物や細菌に至るまでその活性中心付近の構造が類似していることを考えると、単にセリン残基を活性中心とするエステラーゼの活性以外に何らかの生命に共通の必須機能を持つタンパク質の可能性が考えられる。

ちなみに他の生物種ではショウジョウバエでは *PNPLA6* 相同遺伝子欠損はグリアの神経への hyperwrapping、進行性神経変性を招き、フォスファチジルコリンが上昇、また、zebrafish では運動ニューロンの異常が観察される¹⁴⁾ が、線虫では RNAi では異常なし、酵母では PC 合成の調節に与するものの正常、とあまり遺伝子欠損が影響を受けない生物種もある。

マウスで Cre-loxP 系を用いて脳でのみ遺伝子を欠損させた例が 2004 年に報告されているが、海馬、プルキニエ細胞等の神経細胞消失と空胞変性が観察されている。行動異常も報告されている¹⁵⁾。

一方、運動ニューロンの疾患で *PNPLA6* 遺伝子に変異を持つ家系が知られていることから、このタンパク質が神経系にとって重要なことは間違いなさそうである^{16,17)}。

器官や組織によっても NTE タンパク質の機能の貢献度は異なると考えられるが、今回の我々が作製した遺伝子挿入マウスのような産生過剰例はショウジョウバエでしか報告されていない。ショウジョウバエの場合、細胞内膜構造異常・空胞変性・細胞死が生じ、フォスファチジルコリンが減少する。

細胞レベルの研究や^{18~21)} や今後の曝露実験の結果が待たれるが、ショウジョウバエのケースと同様、マウスでも NTE は器官・細胞内で適量発現されることが重要と考えられる。

Winrow らはヘテロノックアウトマウスと正常

マウスに有機リンを投与した結果から、マウスの *PNPLA6* 遺伝子の発現低下つまり NTE 発現の低下が多動性などの神経症状を引き起こすと結論していたが⁶⁾、これに対しては主に毒性学の研究者から有機リン投与の場合、発現低下が問題ではなく、NTE の活性中心での有機リンとの共有結合後、有機リンのアルキル基が欠落するいわゆる Aged Esterase の産物が OPIDN 様の症状を引き起こしている可能性が高いとの指摘がある。我々は NTE と有機リンの複合化合物が種々の神経症状を引き起こす可能性があると考えており、OPIDN について言えば、後者の可能性が高いのではないかと考える。この問題を明らかにするには分子的にはまず、その複合化合物や Aged Esterase を確実に定量する系が必要であり、今後 NTE 高発現細胞における質量分析をするとともに、今回作製に成功したマウスに DDVP などの有機リンを投与し、OPIDN やシックハウス症候群様の症状を惹起させるモデル系を提供出来ればよいと考える。

文献

- Richardson RJ, Hein ND, et al. Neuropathy target esterase (NTE): overview and future. *Chemico-Biological* 203: 238-244, 2013
- Matsuzaka Y, Kikuti Y, et al. Association study between sick building syndrome and polymorphisms of seven human detoxification genes in the Japanese. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29, 190-194, 2010
- Matsuzaka Y, Ohkubo T, et al. Association of sick building syndrome with neuropathy target esterase (NTE) activity in Japanese. *Environmental Toxicology* in press 2013 Feb 18. Doi:10.1002/tox.21839. (Epub ahead of print)
- 渡部和男
<http://www.maroon.dti.ne.jp/bandaikw/archiv/pesticide/insecticide/organophos/DDVP2010.pdf>
- 斎藤亜矢、割田貴之、他. 鶏卵における Neuropathy Target Esterase 活性と有機リンの影響. *臨床環境* 20 : 54-60, 2011
- Winrow CJ, Hemming ML, et al. Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. Published online 17 March 2003; doi: 10.1038/ng1131
- Francis BM, Metcalf RL, et al. Toxicity of organophosphorus esters to laying hens after oral and dermal administration. *Environ. Sct Health B20*: 73-95, 1985
- Johnson MK. The Anomalous Behaviour of Dimethyl Phosphates in the Biochemical Test for Delayed Neurotoxicity. *Arch Toxicol* 41: 107-110, 1978
- Moser M, Li Y, et al. Placental Failure and Impaired Vasculogenesis Result in Embryonic Lethality for Neuropathy Target Esterase-Deficient Mice. *Molecular and cellular biology*, 1667-1679, 2004
- Quistad GB, et al. Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase. *Proc Natl Acad Sci* 100: 7983-7987, 2003
- Atkins J, Glynn P. Membrane associated of and critical residues in the catalytic domain of human neuropathy target esterase. *J Biol Chem* 275: 24477-24483
- Ohtsuka M, Miura H, et al. Improvement of pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) by iCre mRNA-mediated site-specific recombination. *Transgenic Res* Aug 22: 873-875, 2013 doi: 10.1007/s11248-013-9703-x. Epub 2013 Mar 26
- Mizutani A, Kikkawa E, et al. Modified S/MAR episomal vectors for stably expressing fluorescent protein-tagged transgenes with small cell-to-cell fluctuations. *Analytical Biochemistry* 443: 113-116, 2013
- Song Y, Wang M, et al. Knockdown of PNPLA6 protein results in motor neuron defects in zebrafish. *Disease Models & Mechanisms* 6: 404-413, 2013
- Akassoglou K, Malester B, et al. Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration. *PNAS* 101: 5075-5080 (14)
- Rainer S, Bui M, et al. Neuropathy Target Esterase Gene Mutations Cause Motor Neuron Disease. *The American journal of Human Genetics* 82: 780-785, 2008
- Rainer S, Albers JW, et al. Motor neuron disease due to neuropathy target esterase gene mutation: Clinical features of the index families. *Muscle Nerve* 43: 19-25, 2011
- Li Z, Szurek PF, et al. Neuronal differentiation of NTE-deficient embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330: 1103-1109, 2005
- Chen J, Xu L, et al. Inviroment of neuropathy target esterase in tri-ortho-cresyl phosphate-induced testicular spermatogenesis failure and growth inhibition of spermatogonial stem cells in mice. *Toxicology Letters* 211: 54-61, 2012
- Glynn P. Neuronal phospholipid deacylation is essential

for axonal and synaptic integrity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1831: 633-641, 2013

- 21) Ozawa A, Kadowaki E, et al. Acetylcholine esterase is a regulator of GFAP expression and a target of dichlorvos in astrocytic differentiation of rat glioma C6 cells. *Brain Res* 1537: 37-45, doi: 10.1016, 2013