

平成 21 年 5 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590285  
 研究課題名（和文） ニューロセルピン遺伝子変異による家族性神経変性疾患モデルマウスの分子病態解析  
 研究課題名（英文） Molecular pathogenesis of familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies  
 研究代表者  
 平賀 紘一（HIRAGA KOICHI）  
 富山大学・大学院医学薬学研究部・教授  
 研究者番号：40004733

## 研究成果の概要：

変異型神経特異的セリンプロテアーゼインヒビタ（ニューロセルピン）は家族性ニューロセルピン封入体脳症の原因となる。数種の変異型ヒトニューロセルピンが知られているが、今回、人では最も劇症型を起こすと言われる G392E ニューロセルピンをニューロンでのみ発現するトランスジェニックマウスを作製し、変異型ニューロセルピンのニューロン内蓄積機構とその結果起こるニューロンの機能障害の原因を追及した。その結果、変異型ニューロセルピンは発現量、変異部位、加齢に依存してニューロン小胞体とリソゾームに蓄積し、代謝分解量を超える合成量が有れば、加齢と共に病的変化を起こすことを明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	600,000	4,200,000

研究分野：神経病態学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：変異ニューロセルピン、免疫電顕、封入体形成機構、小胞体、リソゾーム

## 1. 研究開始当初の背景

4種のヒトニューロセルピン（NSER）変異体が家族性ニューロセルピン封入体脳症（FENIB）患者から同定されたが、G392E型患者は封入体量が最も多く、神経症状は激烈で発症時期も最も早い劇症型FENIBを起こす。

患者ではまだ明らかにされていない、神経学的異常、神経細胞死、及び封入体形成の機構を調べることを目的として神経細胞にのみ G392E-NSER を発現するトランスジェニック

クマウス（G392E-Tgマウス）を作成し、in vivo 及び in vitro の性質を研究し、本疾患発症の分子機構解析が極めて有効と思われる程度しか本疾患についての研究が進んでいなかったことが研究開始当初の時期的背景であった。

## 2. 研究の目的

Tg-マウス脳及び脊髄を用いて細胞生物学的、生化学的、及び免疫組織化学的性質を調べ、

患者が示す神経学的症状の分子機構及び神経細胞内における変異タンパク質の処理機構の存在を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 変異型 NSER の蓄積の有無---我々は、G392E-Tg マウス系統を既に確立していたので、この過程で同時に確立された対照野生種 NSER を発現する Tg マウス (WT-Tg マウス) 系統と非 Tg (Non-Tg) マウスから得た神経組織をジェンダー固定し、中枢神経系の異なる部位のニューロン中での G392E-NSER 蓄積を、抗ヒト NSER 抗体を使った免疫染色で経時的に調べた。

(2) 抗ヒト NSER 抗体陽性物質の密度の変化---異なる週齢の Tg マウス脳ホモジネートを作り、蔗糖密度勾配遠心法により分画した試料中での変異型 NSER の分布を Western 法で解析し、蓄積物質の密度変化を調べた。

(3) 発現量と変異型 NSER 蓄積の関係---Tg マウス系統は、まず、ヘミザイゴート (n) として樹立される。この中の雄雌を交配すると、2倍体 (2n) が得られる。これらのマウスは変異型 NSER の発現量も 1:2 になる。野生種 NSER-Tg マウスも同様に n と 2n 系統を作り、それぞれのマウスにおける NSER の蓄積量を脳ホモジネートと抗ヒト NSER 抗体を使った Western 法で生後 12 ヶ月まで追跡した。

(4) 免疫電顕法による変異型 NSER 蓄積物の細胞内局在の決定---パラフォルムアルデヒド固定脳資料を抗ヒト NSER 抗体と反応させ、電顕レベルの細胞内局在を調べた。

### 4. 研究成果

(1) 変異型 NSER-Tg マウスは中枢神経系全領域のニューロンに抗ヒト NSER 抗体陽性物質を持っていた。この陽性物質は、染色される細胞中の面積から、経時的に増加していることが知られた。

(2) 変異型 NSER の蓄積体は加齢と共に密度を増し、核が沈降する画分に共存するまでに巨大化した。

(3) 抗ヒト NSER 抗体陽性物質の増加速度は 1 倍体より 2 倍体の方が明らかに速く、発現量が多ければ蓄積量の増加が多いことが示された。

(4) 免疫電顕法では、抗ヒト NSER 抗体陽性物質は小胞体内腔とリソゾームから検出された。

(5) 野生種ヒト NSER は、これら 1) から 4) までの変化を起こさず、従って、ニューロン内の蓄積は変異構造を持つ NSER に限ることが示された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Kawaguchi H., Okamoto, S., Sikdar, D., Kume, A., Li, F., Mohafez, O. M. M., Shehata, M. H., and Hiraga, K. (2009) Genomic organization of regions that regulate chicken glycine decarboxylase gene transcription: physiological and pathological implications. *Gene* 432, 7-18. 査読有
- ② Kikuchi, G., Motokawa, Y., Yoshida, T., and Hiraga, K. (2008) Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc. JPN. Acad., Ser. B.* 84, 246-263. 査読有
- ③ Kato I., Oya, T., Suzuki, H., Takasawa, K., Ichsan, A. M., Nakada, S., Ishii, Y., Shimada, Y., Sasahara, M., Tobe, K., Takasawa, S., Okamoto, H., Hiraga, K. (2008) A novel model of insulin-dependent diabetes with renal and retinal lesions by transgenic expression of CaMKII (Thr286Asp) in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24, 486-497. 査読有
- ④ Takasawa, A., Kato, I., Takasawa, K., Ishii, Y., Yoshida, T., Shehata, M. H., Kawaguchi, H., Mohafez, O. M. M., Sasahara, M., and Hiraga, K. (2008) Mutation-, aging-, and gene dosage-dependent accumulation of neuroserpin (G392E) in endoplasmic reticula and lysosomes of neurons in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 283, 35606-35613. 査読有
- ⑤ Nakanishi, Y., Tsuneyama, K., Nomoto, K., Fujimoto, M., Salunga, T. L., Nakajima, T., Miwa, S., Murai, Y., Hayashi, S., Kato, I., Hiraga, K., Hsu, D. K., Liu, F.-T., and

Takano, Y. (2008) Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in galectin-3 knockout mice. *Hepatol. Res.* 38, 1241-152  
査読有

⑥ Shimada, I., Matsui, K., Brinkmann, B., Hoh, o. ff., .C., Hiraga, K., Tabuchi, Y., Takasaki, I., Kato, I., Kawaguchi, H., Takasawa, K., Iida, R., Takizawa, H., Matsuki, T. (2008) Novel transcript profiling of diffuse alveolar damage induced by hyperoxia exposure in mice: normalization by glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Int. J. Legal Med.* 122, 373-383. 査読有

⑦ Abdel-Aziz H. O., Murai, Y., Takasaki, I., Tabuchi, Y., Zheng, H-C., Nomoto, K., Takahashi, H., Tsuneyama, K., Kato, I., Hsu, D.K., Liu, F-T., Hiraga, K., and Takano, Y. (2008) Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to NNK-induced lung tumorigenesis: an oligonucleotide microarray study. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134, 777-788. 査読有

⑧ Hibino, Y., Usui, T., & Hiraga, K. (2007). Transcriptional modulation by nuclear matrix protein P130/MAT3 associated with MAR/SAR. In *Nuclear Dynamics*, Nagata, K., & Takeyasu, K. eds., pp. 255-262, Springer, New York  
査読有

⑨ Umemura, K., Kato, I., Hirashima, Y., Ishii, Y., Inoue, T., Aoki, J., Kono, K., Oya, T., Hayashi, N., Hamada, H., Endo, S., Oda, M., Arai, H., Kinouchi, H., and Hiraga, K. (2007) Neuroprotective role of transgenic PAF-acetyl hydrolase II in mouse models of focal cerebral ischemia. *Stroke* 38, 1063-1068. 査読有

[学会発表] (計 約 20 件)  
本研究に関連し、代表的な発表例

① 川口 博、高畑正裕、張鴻、常山耕一、鄭華川、平賀紘一：CCl<sub>4</sub> 障害肝に誘導されるガレクチン-3 の役割. *BMB2008* (第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会)，2008, 12, 11 神戸

② 加藤一郎：家族性早期発症型認知症 FENIB モデルマウスにおいて変異型ニューロセルピン (G397E) は小胞体とリゾソームに蓄積する. *BMB2007* (日本生化学会、日本分子生物学会合同年会) 2007, 12. 13 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平賀 紘一 (HIRAGA KOICHI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授  
研究者番号：4 0 0 0 4 7 3 3

### (2) 研究分担者

加藤 一郎 (KATO ICHIRO)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授  
研究者番号：5 0 2 5 0 7 4 1  
川口 博 (KAWAGUCHI HIROSHI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・助教  
研究者番号：5 0 3 6 1 9 5 2

### (3) 連携研究者

なし