

平成22年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500365
 研究課題名（和文）：骨異常と片眼性異常が認められたアスパラギン酸グルタミン酸輸送体欠損マウス
 研究課題名（英文）：Bone abnormalities and unilateral eye deterioration in aspartate-glutamate carrier deficient mice
 研究代表者
 飯島 幹雄 (IIJIMA MIKIO)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：00305111

研究成果の概要（和文）：

アスパラギン酸グルタミン酸輸送体欠損マウス(citrin^{-/-}, aralar^{+/-}マウス)の体重増加は、citrin^{-/-}マウスと比較すると、緩やかであり、成長障害が認められた。また、骨密度は citrin^{-/-}, aralar^{+/-}マウスで低かった。Citrin^{-/-}, aralar^{+/-}マウスに糖質を負荷したが、成人発症 II 型シトルリン血症モデルマウスである citrin^{-/-}, mGPDH^{-/-}マウスと異なり、血中アンモニア濃度に変化はなかった。Citrin^{-/-}, aralar^{+/-}マウスにおいて片眼性の異常が観察された個体について、約一年間観察を続けたが両眼性の異常が出現した個体は観察されなかった。

研究成果の概要（英文）：

Aspartate-glutamate carrier deficient mice (citrin^{-/-}, aralar^{+/-} mice) demonstrated growth retarded rate and bone abnormalities compared with their citrin-KO (citrin^{-/-}, aralar^{+/+} mice) littermates. Citrin^{-/-}, aralar^{+/-} mice fail to display hyperammonemia after oral administration of sucrose which is one of features of human type II citrullinemia model mice, citrin^{-/-}, mGPDH^{-/-} mice. No citrin^{-/-}, aralar^{+/-} mice which is suffer from unilateral eye deterioration demonstrated both eye aberrations up to 1 year.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：アスパラギン酸グルタミン酸輸送体

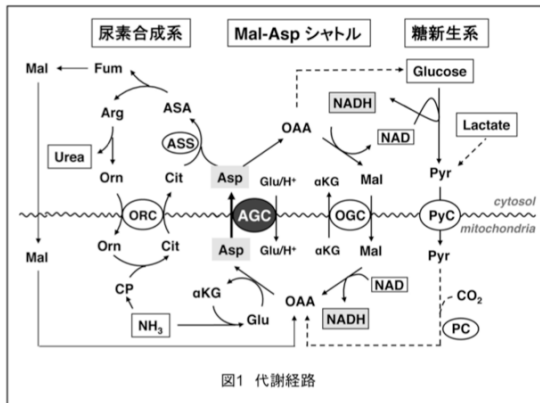
1. 研究開始当初の背景

申請者らは、高アンモニア血症を伴い、肝臓特異的にアルギニノコハク酸合成酵素タ

ンパク質が低下する成人発症 II 型シトルリン血症の責任遺伝子 *SLC25A13* を同定し、その遺伝子がコードするタンパク質を citrin

と命名した(文献1)。Citrinはミトコンドリアの内膜に局在し、主に肝臓や心筋、腎臓で発現が高い肝型アスパラギン酸・グルタミン酸輸送体(AGC)であり、リンゴ酸・アスパラギン酸(MA)シャトルの一員として細胞質NADH還元当量をミトコンドリアへ輸送すると共に、ミトコンドリアで生じたアスパラギン酸を細胞質へ輸送し尿素サイクルに供給する役割を担っている(図1、文献2)。AGCには、もう一つのアイソフォームであるスペインのSatrusteguiらによってクローニングされたaralar(*SLC25A12*)が報告されている(文献3)。Citrinとアミノ酸配列で約80%相同であるaralarは、主に脳や骨格筋、心筋で強く発現している脳型AGCであり、citrinとは発現する器官に相違がある。申請者らは、citrin-KOマウス(文献4)やaralar-KOマウス(文献5)を作製し、カナダ、アメリカ、スペインのグループとの共同研究により、その表現型について分子細胞生物学的解析や組織学的解析、行動学的解析などを実施し報告してきた。

その結果、citrin-KOマウスは灌流肝におけるアンモニアからの尿素合成が障害されているなどの代謝上の異常があるが、見かけ上健康であり、脳や骨格筋、心筋などにおいても顕著な変化が認められなかった。8か月を超えて飼育したマウスにおいてのみ肝臓で病的変化を示唆する所見が観察されたのみであった。ヒトのシトルリン欠損症である成人発症II型シトルリン血症モデルマウスに



関しては、単なるcitrin-KOマウス作製では不十分であった。マウス肝臓でヒトの20倍活性の高いもう一つのNADHシャトルであるグリセロリン酸シャトルの要であるミトコンドリア局在グリセロリン酸脱水素酵素(mGPDH)-KOマウスとcitrin-KOマウスとの交配により得たダブル-KOマウスの作出により確立できた(文献6)。

一方、aralar-KOマウスでは、生後、脳や運動器官を含む体の発育障害がおこり、生後3週以内に痙攣をおこし、突然死することを見いだした。これは、顕著な有髄神経線維の

形成不全(特に、脳梁や大脳皮質の髄質、皮質脊髄線維など)により引き起こされ、神経細胞によるアスパラギン酸の合成不全とそれに伴うミエリン前駆物質であるN-アセチルアスパラギン酸の産生障害が関与すると考えられる。最近になってaralarの変異を持つ、痙攣を伴った低ミエリン症の患者が報告(文献7)されているが、発症機序など不明な点が多く残されている。そのため、ヒトaralar欠損症動物モデルの開発が期待されている。

文献

- 1) Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Saheki T (他11名, 3番目): The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat. Genet.*, 22, 159-163, 1999.
- 2) Palmieri L, Iijima M, Palmieri F (他8名, 6番目): Citrin and aralar1 are Ca^{2+} -stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J*, 20, 5060-5069, 2001.
- 3) del Arco A and Satrustegui J: Molecular cloning of aralar, a new member of the mitochondrial carrier superfamily that binds calcium and its present in human muscle and brain. *J Biol. Chem.*, 273, 23327-23334, 1998.
- 4) Sinasac DS, Iijima M, Saheki T (他7名, 6番目): *Slc25a13*-knockout mice harbor metabolic deficits but fail to display hallmarks of adult-onset type II citrullinemia. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 527-536, 2004.
- 5) Jalil MA, Iijima M, Nakagawa S, Saheki T (他14名, 5番目): Reduced N-acetylaspartate levels in mice lacking aralar, a brain- and muscle-type mitochondrial aspartate-glutamate carrier. *J Biol. Chem.*, 280, 31333-31339, 2005.
- 6) Iijima M, Saheki T (他11名, 1番目): Human citrin deficiency model mouse. *J Inherit. Metab. Dis.*, 29 (suppl. 1), 128, 2006.
- 7) Wibom R (他10名): AGC1 deficiency associated with global cerebral hypermyelination. *N Engl. J Med.*, 361, 489-495, 2009.

2. 研究の目的

Aralar-KOマウスは生後短期間で痙攣をおこし死亡するため、成長後の表現型検索が

できない。そこで $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスを作製することにより、 alaral 欠損による表現型変化がマイルドに顕在化することを期待した。 $\text{Citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスの育種を行い、成長後の表現形検索を行い、新たなモデル動物の基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

Aralar-K0 マウスは生後短期間で痙攣をおこし死亡する。一方、 citrin-K0 マウスは見かけ上正常で繁殖可能なため、 $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスと $\text{citrin}^{+/+}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスとの交配によって誕生したマウスの遺伝子型を検査することにより $\text{citrin}^{+/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスを得た。この $\text{citrin}^{+/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスを兄妹交配することにより $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスと $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/+}$ マウスを得た。実験には $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスと $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/+}$ マウスとの交配により得られた個体を用い、体重変化、臓器の形態学的変化等を経時的に検討した。

4. 研究成果

(1) $\text{Citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスの成長曲線と生存率

$\text{Citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスと $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/+}$ マウスの誕生後の成長曲線を、図2に示した。雌雄共に、 $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスの誕生後の体重増加は、対照である $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/+}$ マウスと比べ少なく、成

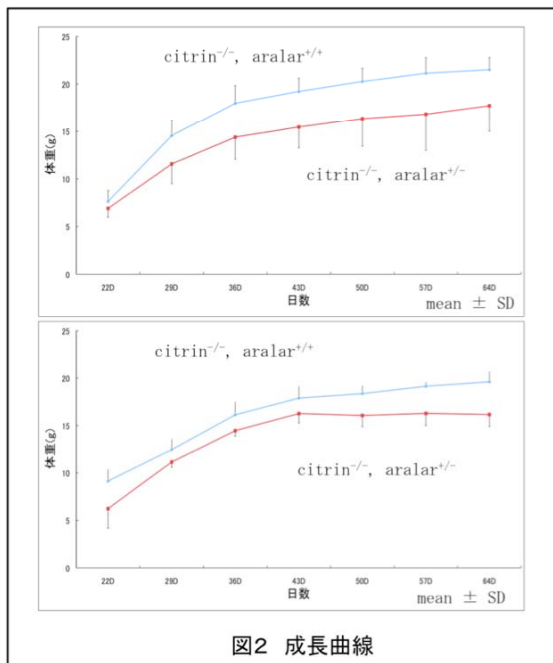


図2 成長曲線

長障害が認められた。また、体重測定終了時である生後64日目の時点で、 $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスの生存率は、雄で91%、雌で67%であった。対照である $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/+}$ マウスの生存率は雌雄共に100%であった。

$\text{Citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスの生存率に雌雄差があるか否かは、さらに例数を増して検討する必要があると思われる。

(2) 骨量の測定

生後2ヶ月齢の $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスの骨量を野生型 ($\text{citrin}^{+/+}$, $\text{alaral}^{+/+}$ マウス) と比較した。その結果、 $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスの頸部から胸部にかけて、脊椎の骨量が減少していた。 $\text{Citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/+}$ マウスでは、野生型と同様な結果だった。図3に示した骨量を比較した典型的なレントゲン写真のように、 $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスの首から胸部にかけての脊椎が薄くなっていた。

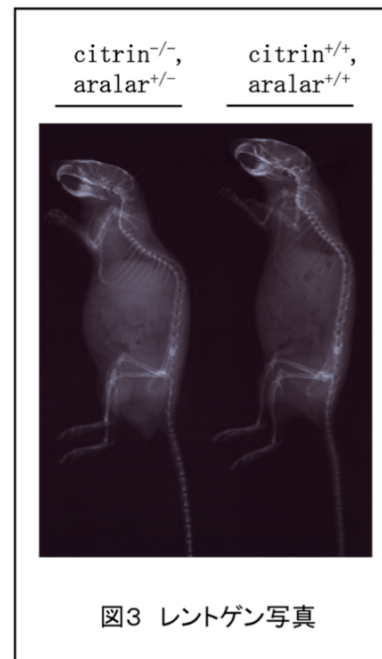


図3 レントゲン写真

(3) 片眼性異常

生後2ヶ月齢以降も生存していた $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスの内、約40%のマウスの右目が白濁していた。右目が白濁し

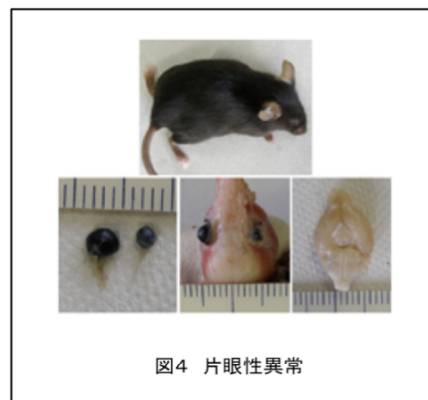
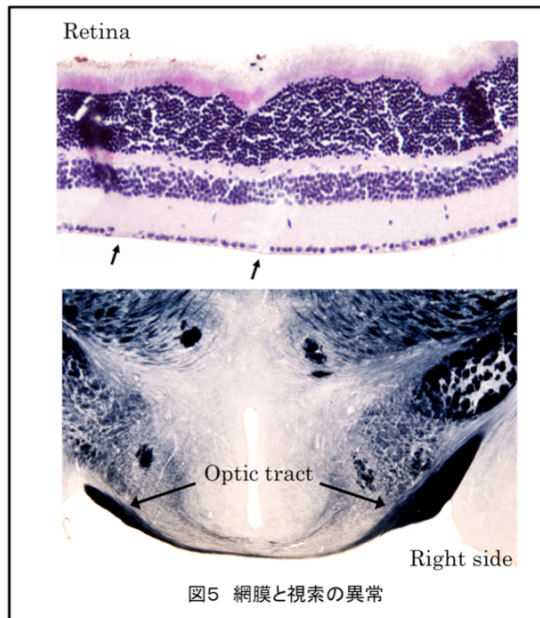


図4 片眼性異常

ている $\text{citrin}^{-/-}$, $\text{alaral}^{+/-}$ マウスでは、脊椎の湾曲が大きく (図4 上段)、頸部から胸部にかけての脊椎骨量も少なかった。白濁し

ていた右目は、正常な左目と比べ大きさも小さかった(図4 下段左、下段中)。右目が白濁していたマウスの脳では、左側の視索が萎縮していた。さらに、組織学的に検討したところ、異常の認められた右目網膜の神経節細胞層に細胞の欠損部位があった(図5 上段矢印)。また、右側と比べ左側の視索が萎



縮していることが組織学的にも確認できた。さらに、脳の視床領域にあり網膜からの情報を受け取り、視覚情報を処理する外側膝状体の左側が、右側に比べ萎縮し、神経膠細胞が増加していた。片眼性の異常が認められたマウスを、約一年間観察したが、両眼性の異常へと進んだ個体は観察されなかった。

(4) 血中アンモニア濃度

成人発症 II 型シトルリン血症モデルマウスである citrin^{-/-}, mGPDH^{-/-}マウスでは、患者で認められるように、糖質を嫌い、糖質負荷により血中アンモニア濃度が上昇することが知られている。そこで、citrin^{-/-}, aralar^{+/-}マウスにおいても、代謝上の異常が発現するか検討した。その結果、糖質負荷、絶食においても血中アンモニア濃度に変化は認められなかった。

(5) 今後の展望

ヒト aralar 欠損症の患者は、2009 年に報告された一例が知られている。患児は、痙攣や低ミエリン化脳を示しているが、3 歳時では体重と身長は正常範囲であると報告されている。Aralar-KO マウスが、生後 3 週間程度で死亡することと比べ、症状の程度に差が見受けられる。また、citrin^{-/-}, aralar^{+/-}マウスで、認められた片眼性の異常についても、先の患児では報告されていない。今回の

citrin^{-/-}, aralar^{+/-}マウスで認められた異常の発症機構については、未解明の部分が多く残されているので、ヒト aralar 欠損症との比較も含めて、さらに検討する必要がある。

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 3 件)

1. Hutchin T, Iijima M (他 10 名、8 番目) : Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD) as a cause of liver disease in infants in the UK. *J Inherit. Metab. Dis.*, 査読有り, 巻無, 2009

2. Saheki T, Iijima M (他 16 名、2 番目) : Citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double knock-out mice recapitulate features of human citrin deficiency. *J. Biol. Chem.*, 査読有り, 282, 2007, 25041-25052.

3. Contreras L, Gomez-Peurtas P, Iijima M, Kobayashi K, Saheki T, Satrustegui J: Ca²⁺ activation kinetics of the two aspartate-glutamate mitochondrial carriers aralar and citrin: Role in heart malate-aspartate NADH shuttle. *J. Biol. Chem.*, 査読有り, 282, 2007, 7098-7196.

[学会発表] (計 1 件)

佐伯武頼, 小林圭子, 飯島幹雄. Citrin/mGPDH ダブルKOマウスを用いるシトルリン欠損症の治療法の開発, 第50回日本先天代謝異常学会総会・第7回アジア先天代謝異常学会, 2008. 11. 6-8, 米子

[その他]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~bioc/hem1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 幹雄 (IIJIMA MIKIO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号 : 00305111

(2) 研究分担者

中河 志朗 (NAKAGAWA SHIROU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号 : 70073666