

---

**短 報**

---

## ヒト神経障害エステラーゼ遺伝子導入細胞の樹立と有機リンの影響について

加賀谷 徹<sup>1)</sup> 本杉 奈美<sup>1)</sup> 水谷 晃子<sup>1)\*</sup> 坂部 貢<sup>2)\*\*</sup>  
加藤 明<sup>2)\*\*\*</sup> 田中正史<sup>1)</sup> 木村 穰<sup>1)</sup>

1) 東海大学医学部分子生命科学領域

2) 東海大学医学部生体構造機能学領域

## The Sensitivity for Organophosphate in the *PNPLA6* cDNA transformed cell line coding for neuropathy target esterase

Toru Kagaya<sup>1)</sup>, Nami Motosugi<sup>1)</sup>, Akiko Mizutani<sup>1)</sup>, Kou Sakabe<sup>2)</sup>, Akira Katoh<sup>3)</sup>,  
Masafumi Tanaka<sup>1)</sup> and Minoru Kimura<sup>1)</sup>

1) Department of Molecular Life Sciences, School of Medicine, Tokai University

2) Department of Anatomy, School of Medicine, Tokai University

3) Department of Physiology, School of Medicine, Tokai University

---

### 要旨

有機リン代謝に関与する神経障害標的エステラーゼ (Neuropathy Target Esterase : NTE) をコードする *PNPLA6* (Patatin-like phospholipase domain containing 6) cDNA を発現する HEK293細胞を作製し、有機リンの一種で殺虫剤などにも含まれているジクロロボス (DDVP : Dimethyl 2, 2-dichlorovinyl phosphate) を投与した場合の細胞増殖や NTE 活性に対する影響を検討した。安定な *PNPLA6* 遺伝子導入高発現細胞樹立したが、その NTE 活性はベクター DNA のみの導入細胞に比べ、細胞当たりでも総タンパク質量当たりでも数十倍以上であった。DDVP10 $\mu$ M の条件下では、遺伝子導入の有無にかかわらず細胞増殖に影響を与えなかったが、50 $\mu$ M では細胞増殖が低下もしくは遅延した。一方、10 $\mu$ MDDVP 下でも NTE 活性においては高発現細胞でも活性の著しい低下がみられると同時に、特に抵抗性 (耐性) を獲得するようには見受けられず、後に活性を回復した。活性回復は DDVP50 $\mu$ M の条件下でも認められた。

以前の実験も合わせると、DDVP は直接細胞増殖に悪影響を及ぼすというよりも NTE-有機リン (DDVP) 複合体を介して細胞の機能を低下させるのではないかと推察された。

---

受付 : 2023年 8月 6日 採用 : 2023年 8月 18日

責任著者 : 木村 穰

東海大学医学部分子生命科学

〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143

kimura@is.icc.u-tokai.ac.jp

\* 帝京平成大学健康メディカル学部健康栄養学科

\*\* 千葉大学予防医学センター

\*\*\* 東海大学医学部生体機能学領域

(臨床環境 32 : 18 - 27, 2023)

---

《キーワード》神経障害エステラーゼ、*PNPLA6* 遺伝子、遺伝子導入細胞、有機リン、ジクロロボス

---

## Abstract

HEK293 cells transfected with the *PNPLA6* (Patatin-like phospholipase domain containing 6) gene, coding for Neuropathy Target Esterase (NTE), which is involved in organophosphorus metabolism, were established. We investigated the effects of dichlorvos (DDVP) on cell proliferation and NTE activity. In general, the toxicity of some organic phosphorus such as DDVP is known to be acute toxicity due to cholinesterase (AChE) inhibitory action, as well as delayed neurotoxicity (OPIDN: Organophosphorus-induced Delayed Neurotoxicity). The NTE activity of the stable *PNPLA6* transformant was about 20 times higher per cell and per total protein than in cells introduced with only vector DNA. At 10  $\mu$ M, DDVP did not affect cell proliferation regardless of the presence or absence of the *PNPLA6* gene, but at 50  $\mu$ M of DDVP caused the decrease or delay of cell proliferation. On the other hand, even at a low concentration of 10  $\mu$ M DDVP, which does not affect cell proliferation, NTE activity was significantly reduced even in *PNPLA6* gene-introduced high-expressing cells (20 times the activity of the control), indicating that resistance (tolerance) was acquired. was not seen in

We established a system of cells for examining NTE activity and organophosphate sensitivity, and also a basis for discussing the function of the *PNPLA6* gene and the effects of the NTE-organophosphate (DDVP) complex.

(Jpn J Clin Ecol 32 : 18 - 27, 2023)

---

《Key words》Neuropathy Target Esterase, *PNPLA6* gene, Transformed Cells, Organophosphate, Dichlorvos

---

## 緒言

シックハウス症候群とは、住宅に由来する様々な健康傷害の総称である。倦怠感・めまい・頭痛・湿疹・のどの痛み・呼吸器疾患などの症状があらわれるが、ホルムアルデヒドやトルエン、キシレン、有機リンなどの種々の空気汚染物質によってもたらされる慢性疾患とされている<sup>1,2)</sup>。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等13物質に指針値があるが、農薬、殺虫剤等にもDDVP等の有機リンは多用されている<sup>3)</sup>。

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の一つとして神経障害標的エステラーゼ (Neuropathy Target Esterase : NTE) をコードする *PNPLA6* (Patatin-like phospholipase domain containing 6) 遺伝子を

同定することができた<sup>4,5)</sup>。ヒト *PNPLA6* 遺伝子は染色体19p13.2に存在し、コードされる NTE は有機リン代謝にも関与するリゾホスホリパーゼである<sup>6-8)</sup>。一般的に、有機リンの毒性としてはコリンエステラーゼ (AChE) 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 (OPIDN : Organophosphate-induced delayed neuropathy) 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<sup>9)</sup>。実際、有機リンの多くは NTE の酵素活性中心である Ser 残基に共有結合し、その活性を失わせるが、ジクロロボス (DDVP : Dichlorvos) を代表とする一部の有機リンは NTE に共有結合したまま、自らの aryl 基が加水分解によって離脱することにより、OPIDN を発症すると考えられている<sup>10-12)</sup>。

我々はいままでに *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

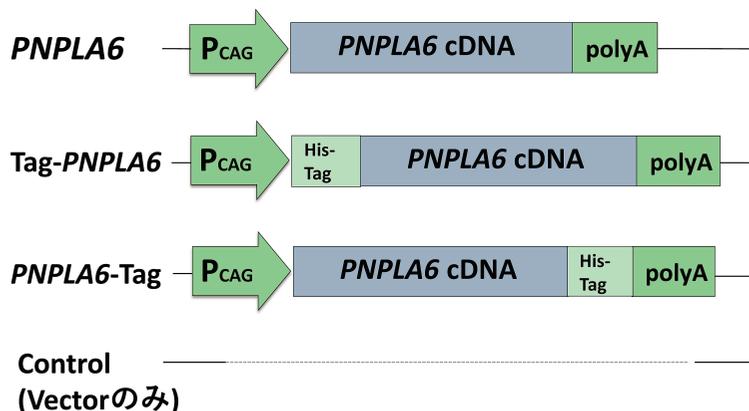


図1 導入遺伝子の構造

い傾向にあること、そして線虫や鶏卵などを用いた動物実験からNTE活性が有機リン暴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<sup>13)</sup>。

本研究では、NTEに対する有機リンの影響を更に理解するために、細胞レベルでの有機リンの影響を調べることを目的として、元々生体での発現が少ないPNPLA6を導入した細胞を作成した。これにより生体へのDDVPの影響をより明確に検討することが出来るようになるとともに、質量分析などで有機リン結合NTE複合体の測定も可能になると考える。

さらに本報告では一過性遺伝子導入細胞での実験に加え、NTEを安定発現するPNPLA6導入細胞を用い、ジクロロボス(DDVP)を投与したときの細胞増殖阻害効果とそのときのNTE活性の推移を検討した。

なおNTE活性測定にはエステラーゼ阻害剤 mipafox が必要であるが、商業ベースでは入手困難となったため、残念ながら活性測定実験を複数回行うことができず、単回の実験となったことをお断りしておく。

## 材料と方法

PNPLA6 遺伝子発現ベクターの作成については、東海大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た(承認番号:10-040-15)。

### 1) PNPLA6 遺伝子導入293細胞の作成

ヒト胎児腎細胞をアデノウイルス E1 遺伝子に

よる形質転換を通じて樹立された細胞株 HEK293 細胞を用いた(細胞倍加時間約20時間)。導入遺伝子は、ウサギβ-アクチンプロモーターにサイトメガロウイルスエンハンサーが挿入された高発現を期待できるプロモーター領域(CAG)の下流にPNPLA6 遺伝子 cDNA が挿入され、さらに遺伝子導入株のセレクションのためには zeocin 耐性遺伝子発現カセットを挿入したミニジーンを作製し(図1)、HEK293細胞に episomal vector<sup>14)</sup> を利用して導入した。なおPNPLA6 cDNA 部分にはN末またはC末にHis-Tagを付加した2種類の融合cDNAベクターも準備した(図1)。

一過性の発現による実験は常法によって行い、トランスフェクション後、時間経過を追って細胞を回収した。安定的発現を示す細胞株の取得には、導入後 zeocin (最終濃度400 μg/ml, Sigma Co. Ltd. USA) によるセレクション操作を行ない、いくつかの細胞コロニーを採取し、別途培養した。個々の細胞コロニーよりDNAを抽出し、PCR法により導入遺伝子の確認を行なった。さらに本研究により様々な条件でNTE活性を検討した。

### 2) NTE 酵素活性の測定<sup>8)</sup>

エステラーゼ活性としては、phenyl valerate (Acca Star Co. Ltd. USA) を基質として、バッファー(50mM Tris-HCl, pH8.0, 20mM EDTA)中での加水分解活性を測定した(5.3mM phenyl valerate, 0.063% DMFA, 0.028% TritonX-100 in buffer)。活性測定には基質加水分解により発色

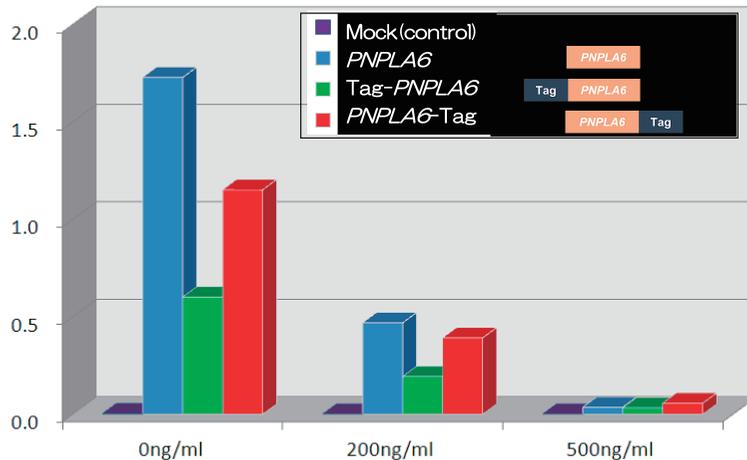


図2 遺伝子導入 HEK293細胞抽出液のNTE 活性と DDVP による活性低下

する potassium hexacyano-ferrate(III) (SIGMA Co. Ltd. USA) を用いた (4 mg/ml)。バッファー中に Paraoxon を添加し (終濃度0.8mM paraoxon, SIGMA)、他のエステラーゼ活性を阻害させるとともに、さらに NTE 活性自身も阻害する Mipaflox (終濃度0.2mM mipaflox, Poly Carbon Industries Inc.) をバッファー中に添加して酵素活性を測定し、失った活性量を NTE 活性とした。一連のエステラーゼ活性の反応停止には終濃度 0.25mg/ml 4-aminoantipyrine (SIGMA Co. Ltd. USA)、36mg/ml SDS を用いた。また DDVP としては DDVP Standard (ジクロロボス: C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P) (Wako Chemicals, Japan) を用いた。

### 3) 細胞培養条件と細胞増殖試験

4.5 g/LD-Glucose, L-Glutamine, Sodium Pyruvate 入りの DMEM 培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco Co. Ltd. USA) に終濃度10%FBS を加え、さらに Penicillin-Streptomycin Solution (Gibco Co. Ltd. USA) を添加して培養用培地とした。6-well dish に細胞を  $9.6 \times 10^4$  播種、1 サンプル当たり 3 well 使用した。24時間後の増殖が対数期に各濃度の DDVP を投与し、0時間、24時間、48時間後の細胞数を Trypan blue で死細胞を染色した後、血球計算盤を使用し測定した。NTE 活性は培養細胞を回収後、測定した。

## 結果

### 1. 一過性 PNPLA6 遺伝子発現細胞での DDVP による NTE 活性阻害効果

今回、我々は細胞レベルでの NTE 活性に対する DDVP の影響について検討した。まず前段階として、一過性に PNPLA6 遺伝子を発現させた HEK293細胞の粗抽出液を用いて DDVP によるエステラーゼ活性の阻害効果について解析を進めた (図2)。図2に示すように、実験では4種類の細胞群に分け、HEK293細胞にベクターのみを導入した Mock 感染群を対照群 (Mock) とし、PNPLA6 遺伝子を導入した細胞 (PNPLA6)、N 末端または C 末端に His-Tag がコードされた PNPLA6 融合遺伝子 (Tag-PNPLA6, PNPLA6-Tag) を導入した細胞も用意した。トランスフェクション後の各細胞粗抽出液の NTE 活性を比較するとともに、DDVP を2種の濃度で添加し、活性の低下の程度を比較検討した。発現量は PNPLA6 遺伝子単独導入細胞のタンパク質量当りで NTE 活性を比較したところ、約1.7umol/min/g だった。一方、N 末に Tag をつけた場合、PNPLA6 遺伝子単独導入細胞と比べ1/3程度に、C 末に Tag を付けた場合は2/3程度の NTE 活性となっていた。

次に、この細胞粗抽出液への DDVP の影響を調べるため200ng/ml, 500ng/ml の DDVP を投与すると、200ng/ml では PNPLA6 cDNA 単独

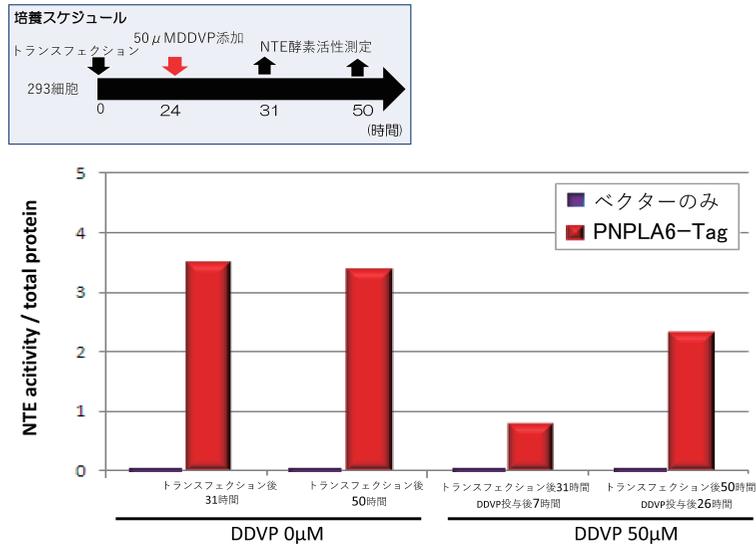


図3 一過性遺伝子導入 HEK293細胞における DDVP 添加による NTE 活性変化

ベクターの細胞抽出液で NTE 酵素活性は24%に減少し、N 末に Tag をつけた場合32%に活性は減少、C 末に Tag を付けた場合33%に活性は減少した。この結果から NTE 酵素活性が高いからと言って DDVP 阻害効果が弱まるわけではなく、むしろ NTE 酵素活性が高いほど DDVP に高感受性傾向の結果が得られた。また DDVP の影響は、どの導入遺伝子タイプでも濃度依存的に認められ、500ng/ml 濃度で DDVP を添加した際には全ての細胞で NTE 酵素活性は検出限界程度まで落ちていた。

次いで HEK293細胞にトランスフェクション後24時間で培養液中に50μM の DDVP を添加し、添加7時間後・26時間後の NTE 酵素活性量を測定した(図3)。C 末に Tag が付いた *PNPLA6* 融合遺伝子 (PNPLA6-Tag) をトランスフェクションした場合、添加後7時間後または26時間後では、通常の培養条件においてはタンパク質量当たりの NTE 活性は約3.5で安定していた。一方、トランスフェクション後24時間後に DDVP を50μM 添加した細胞の NTE 活性は、DDVP 未処理細胞と比較して7時間後では1/4まで減少したが、DDVP 投与後26時間では NTE 活性が80%まで回復していた(図3)。

## 2. *PNPLA6* 遺伝子を安定発現する HEK293細胞での NTE 活性と DDVP による影響

一過性 *PNPLA6* 遺伝子発現では、6-7日間程度でその発現が消失してしまうため、我々が最終的に検討したい遅発性の DDVP 効果など長期間の観察する実験系には不適である。そこで安定的に *PNPLA6* 遺伝子発現を示す HEK293細胞を樹立した(材料と方法の項参照)。ただし、今回使用したものは、HEK293細胞株、episomal ベクターのみを導入した Control 細胞株、*PNPLA6* 遺伝子導入細胞株、N 末端に Tag 配列を挿入した Tag-PNPLA6 融合遺伝子を導入した細胞株の4種類である。

これらの細胞を使用し細胞増殖の変化、NTE 酵素活性量、DDVP への感受性などを検討した(図4、5)。各々の細胞を24時間培養後、DDVP を培養液に添加し、その後の増殖曲線と NTE 酵素活性を測定した。増殖曲線は、細胞を trypan blue により死細胞を青色染色し、生細胞だけを血球計算盤上で測定している。

細胞増殖について HEK293細胞株と比較検討したところ、ベクターのみを導入した Control 細胞株、*PNPLA6* 遺伝子導入細胞株の場合、HEK293細胞株と細胞増殖能に大差はなく、Tag-PNPLA6 融合遺伝子導入細胞株ではそれらの2

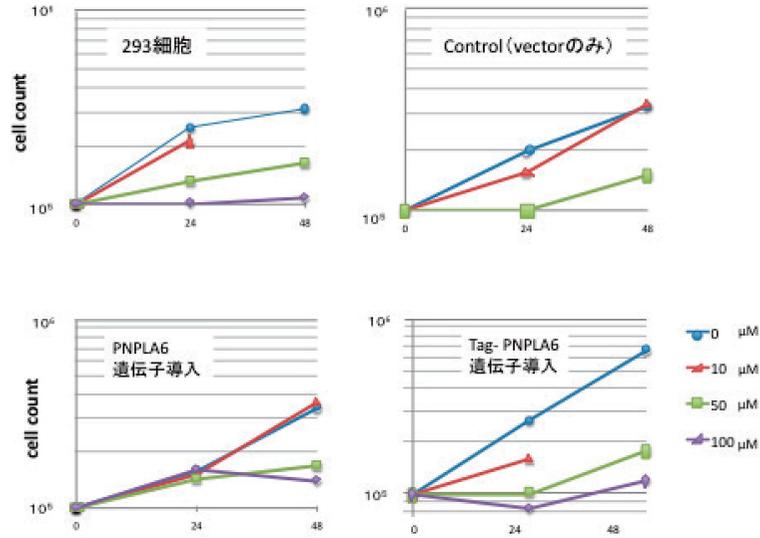


図4 遺伝子導入 HEK293細胞株における細胞増殖性と DDVP の影響 (各細胞株を 3 種の DDVP 濃度下で培養した。)

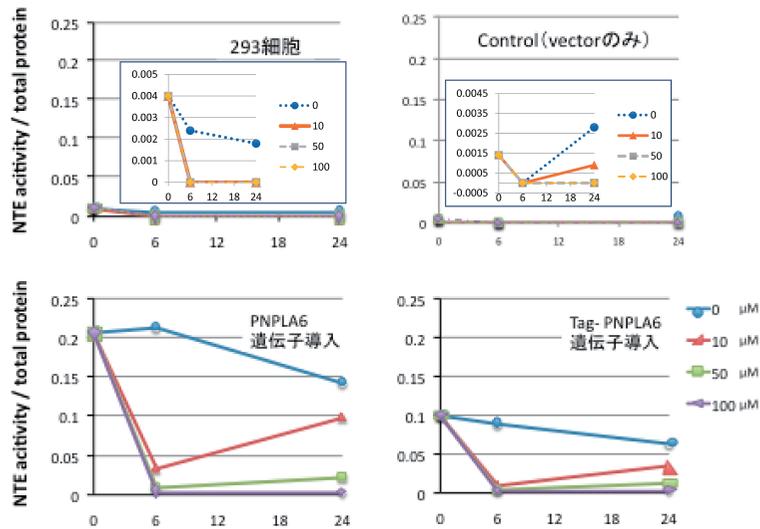


図5 遺伝子導入 HEK293細胞株における DDVP 存在下の NTE 活性変化 (3 種の DDVP 濃度下で測定。上段挿入図では縦軸を拡大。)

倍程度であった (図 4)。DDVP 存在下での増殖では、10 $\mu$ M DDVP では Tag-PNPLA6 融合遺伝子導入細胞株の場合にやや増殖低下が見られたものの増殖曲線に顕著な阻害効果は認められず、50 $\mu$ M、の DDVP 存在下では 24 時間後には細胞増殖の遅延、または停止が全ての株で確認されたが、48 時間後にはほぼ全ての細胞株で増殖能を回復した (図 4)。

次に NTE 酵素活性は、タンパク質量もしくは細胞数当たりの活性量でみると HEK293 細胞株と Control 細胞株には差は見られず、PNPLA6 導入細胞株は Control 細胞株と比べ 120 倍の活性が得られた。また Tag-PNPLA6 融合遺伝子導入細胞株では Control 細胞株と比べ 60 倍の NTE 活性を示した (図 5)。しかしながら、DDVP 投与による NTE 酵素活性の影響を検討したところ、

*PNPLA6* 遺伝子導入により顕著に上昇していた NTE 活性は、 $10\mu\text{M}$  の条件下でも 6 時間で急激に低下することが観測された (図 5)。HEK293 細胞株およびベクター単独導入株のコントロールでは 24 時間後に活性を回復することはなかったが、NTE を発現しうる *PNPLA6* 導入細胞株および Tag-*PNPLA6* 融合遺伝子導入細胞株では  $50\mu\text{MDDVP}$  添加条件でも 24 時間後には活性を部分的に回復することがわかった。ただし  $100\mu\text{M}$  の条件下では酵素活性の回復は認められない (図 5)。

以上のことから NTE 酵素は高発現していても本条件下では有機リン耐性を獲得出来るものではなく、一方、元々の活性の低い HEK293 細胞や Control 細胞であっても、 $10\mu\text{M}$  DDVP の添加により 6 時間で検出限界以下まで NTE 活性が激減するが、24 時間の NTE 活性は幾分回復する傾向があり、細胞増殖は回復傾向にあった。以上の結果から、NTE 活性はごく微量でも存在すれば、細胞活動が正常に営まれるのではないかと推測される。

残念ながら、試薬の mipafox が枯渇し、入手が不可能となったことからこれ以上の NTE 酵素活性に関する解析はできなかった。しかしながら、本研究により、安定的に NTE を高発現する HEK293 細胞を樹立することができた。

## 考察

本論文では NTE をコードする *PNPAL6* 遺伝子を導入した HEK293 細胞を用い、高発現の細胞を作成し、これを用いて DDVP に対する感受性を検討した。

NTE 高発現細胞は、DDVP を添加した場合、もとの HEK293 細胞あるいはコントロールベクターの導入細胞と同様の挙動を示し、DDVP に耐性を獲得する訳ではなかった。しかも、どの細胞でも低濃度の  $10\mu\text{M}$  では増殖にほとんど影響がなかったものの、NTE 活性は高発現細胞では 6 時間ですでに 10 分の 1 以下に激減しており、25 時間程度立たないと回復はみられなかった。したがって、 $10\mu\text{M}$  といった低濃度の曝露では、NTE

活性が一旦激減するが、そのうち、おそらくは遺伝子発現の回復と共に活性を回復するものと思われた。なお、 $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$  でも同様であった。

Winrow 達は *pnpla6* 遺伝子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<sup>15)</sup>。これはその後に胎盤の血管形成の影響と判明したが<sup>16)</sup>、それでもこの *PNPLA6* (*pnpla6*) 遺伝子が生物種を超えて植物やバクテリア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と考えられる<sup>9)</sup>。

そのことからすると一見、今回の結果は矛盾するようにも見えるが、そもそも 293 細胞やベクターだけを導入したコントロール細胞は NTE 活性が検出限界 (*PNPLA6* cDNA 導入細胞の 1/100) 近くの数値を示し、また *PNPLA6* cDNA 導入細胞あるいは tag-*PNPLA6* cDNA 導入細胞も DDVP 投与後の数値は激減しているとはいえ、上記 2 細胞を上回っており、生存に十分量の NTE は存在すると思われる。 $10\mu\text{M}$  の場合だけでなく  $50\mu\text{M}$  程度であっても後に増殖を回復して来ることが上記 2 細胞でも観察されることから DDVP のこの範囲の濃度での投与は細胞を死に至らしめるものではなく、遺伝子発現が回復すれば細胞増殖可能な状態を引き起こすものと考えられる。

*PNPLA6* cDNA が NTE タンパク質そのものを産生するのに対し、tag-*PNPLA6* cDNA の場合は NTE タンパク質の N 末にタンパク質量に有用な His tag を付加した遺伝子産物が産生される。活性は tag-*PNPLA6* cDNA でも十分に高く (*PNPLA6* cDNA 導入細胞の 1/2 ではあるが、コントロール細胞の 60 倍の活性を持つ)、一過性の発現においてもその活性は *PNPLA6* cDNA の場合と変わらず、*in vitro* の細胞粗抽出液の NTE 活性の DDVP 感受性も同等であった (data not shown)。今回の安定的発現細胞でも *PNPLA6* cDNA 導入細胞と tag-*PNPLA6* cDNA 導入細胞はほぼ同様の結果を示したため、His-tag の影響

は少ないと考えられる。

また、一過性の発現でも高発現の細胞は DDVP 投与により NTE タンパク質当りの活性は一時的に下がるが、その後は遺伝子発現再開の影響か、再び活性を回復しており、安定的発現細胞を用いた際の結果でも再現されていると考える。

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するが<sup>17)</sup>、酵母では PC 合成の調節に関与するものの正常<sup>18)</sup>、とあまり遺伝子欠損が影響を受けない生物種もある。NTE は2003年にリゾホスホリパーゼであることが判明するが<sup>8)</sup>、これは膜合成に関与すると予想されるが、Cre-loxP 系を用いてマウス脳でのみ遺伝子を欠損させた例が2004年に報告されており、海馬、プルキニエ細胞等の神経細胞消失と空胞変性、またそれらに伴う行動異常も報告されている<sup>19)</sup>。

一方、今回のような過剰産生例や遺伝子欠損例は細胞レベルで報告されているが、細胞増殖などに及ぼす影響は細胞腫により異なるようである<sup>20,21)</sup>。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 は細胞内で適量発現されることが重要と考えられる<sup>22)</sup>。

Winrow 達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、*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、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った<sup>23)</sup>。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と考える。以前に我々はシックハウス症候群患者では単球の NTE 活性の高い傾向があることを報告

しているが<sup>5)</sup>、鶏卵に DDVP を投与した結果、発生期のニワトリ胚で調べた濃度範囲 (0.5-150mg/Kg) では、活性低下が回復してくるにもかかわらず、ほぼ全例脳内出血を起こすことを報告している<sup>13)</sup>。これは DDVP が活性低下が細胞増殖に影響するというよりは DDVP と NTE の複合体が何らかの別の細胞機能に悪影響を及ぼしているという考えを導くものであり、今回の実験結果を支持する。

この問題をさらに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、今回の安定発現細胞の利用が期待される。

NTE 活性測定に必須の mipafox は現在は残念ながら入手不能な試薬となってしまっているが、*PNPLA6* 変異を保持する疾患が次々報告されていることから、シックハウス症候群のみならず、*PNPLA6* に変異を持つ運動ニューロン疾患をはじめとする多くの神経疾患解析<sup>24-26)</sup> に本研究報告が役立つことを期待する。

## 謝辞

この論文をまとめるにあたり、研究室在籍および OB・OG の方々、酵素活性測定においては生命科学教育研究支援センターの大久保朋一さん他技術職員の方々、機器使用においては健康科学部松木秀明先生、医学部石井恭正先生にご協力をいただき、心から感謝するものである。なお、本研究は主として文部省科学研究費挑戦的萌芽研究 24651064、15K12215 および本論文作成にあたっては 21K06847 の補助を受けた。

## 利益相反

本研究に関わる利益相反はない。

なお、本研究は主に2014年に行われたものであり、当時の著者らは当時の所属とした。

## 参考文献

- 1) 「シックハウス症候群マニュアル 日常診療のガイドブック」日本臨床環境医学会編 東海大学出版会 (2013)

- 2) Chemical Sensitivity and Sick-Building Syndrome. Ed.Y. Yanagasawa, H. Yoshino, S. Ishikawa and M. Miyata, CRC Press (2017)
- 3) ジクロルボス [https://www.chemicoco.env.go.jp/detail.html?word=62-73-7&chem\\_id=301](https://www.chemicoco.env.go.jp/detail.html?word=62-73-7&chem_id=301) (2023/8/1 現在)
- 4) Matsuzaka, Y., Kikuti, Y., Mizutani A., Aoyama, Y., Kakuta, K., Oka, A., Inoko, H., Sakabe, K., Ishikawa, S., Kulski, JK. and Kimura M. Association study between sick building syndrome and polymorphisms of seven human detoxification genes in the Japanese. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29(2), 190-194 (2010)
- 5) Matsuzaka, Y., Ohkubo, T., Kikuti, YY., Mizutani, A., Tsuda, M., Aoyama, Y., Kakuta, K., Oka, A., Inoko, H., Sakabe, K., Ishikawa, S., Kulski, JK. and Kimura, M. Association of sick building syndrome with neuropathy target esterase (NTE) activity in Japanese. *Environmental Toxicology* 2014 Oct; 29(10): 1217-26. Doi: 10.1002/tox.21839.
- 6) Richardson, RJ., Hein, ND., Wijeyesakere, SJ., Fink, JK. and Makhaeva, GF. Neuropathy target esterase (NTE): overview and future. *Chemico-Biological* 203 238-244 (2013)
- 7) Atkins, J. and Glynn P. Membrane associated of and critical residues in the catalytic domain of human neuropathy target esterase. *J. Biol. Chem.* 275(32), 24477-24483
- 8) Quistad, GB *et al.* Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(13), 7983-7987 (2003)
- 9) Richardson, RJ., Fink, JK., Glynn, P., Hufnagel, RB., Makhaeva, GF. And Wijeyesakere, SJ. Neuropathy target esterase (NTE/PNPLA6) and organophosphorus compound-induced delayed neurotoxicity (OPIDN) *Advances in Neurotoxicology*, Vol.4 Chapter 1 pp.1-78 ISSN 2468-7480 (2020) Elsevier Inc.
- 10) Glynn, P. Neuronal phospholipid deacylation is essential for axonal and synaptic integrity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1831 633-641 (2013)
- 11) Francis, BM., Metcalf, RL. and Haneen, LC. Toxicity of organophosphorus esters to laying hens after oral and dermal administration. *Environ. Sct. Health.* B20(1) 73-95 (1985)
- 12) Johnson, MK. The Anomalous Behaviour of Dimethyl Phosphates in the Biochemical Test for Delayed Neurotoxicity. *Arch Toxicol* 41 107-110 (1978)
- 13) 斎藤亜矢, 割田貴之, 大久保朋一, 津田道雄, 中村健司, 坂部貢, 木村穰: 鶏卵における Neuropathy Target Esterase 活性と有機リンの影響. *臨床環境医学* 20 巻 1号 54-60 (2011)
- 14) Mizutani, A., Kikkawa, E., Matsuno, A., Shigenari, A., Okinaga, H., Murakami, M., Ishida, H., Tanaka, M. and Inoko, H. Modified S/MAR episomal vectors for stably expressing fluorescent protein-tagged transgenes with small cell-to-cell fluctuations. *Analytical Biochemistry* 443 113-116 (2013)
- 15) Winrow, CJ., Hemming, ML., Allen, DM., Quistad, GB., Casida, JE., Barlow, C. Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. Published online 17 March 2003; doi: 10.1038/ng1131
- 16) Moser, M., Li, Y., Vaupel, D., Kluge, R., Glynn, P. And Buettner, R. Placental Failure and Impaired Vasculogenesis Result in Embryonic Lethality for Neuropathy Target Esterase-Deficient Mice. *Molecular and cellular biology*, 1667-1679 (2004)
- 17) Kretzschmar, D., Hasan, G., Sharma, S., Heisenberg, M. and Benzer, S. The Swiss Cheese Mutant Causes Glial Hyperwrapping and Brain Degeneration in *Drosophila*. 17(19), 7425-7432 (1997)
- 18) Zacheo, O., Dinsdale, D., Meacock, PA and Glynn, P. Neuropathy Target Esterase and Its Yeast Homologue Degrade Phosphatidylcholine to Glycerophosphocholine in Living Cells. *J. Biol. Chem.* 279(23), 24024-24033 (2004)
- 19) Akassoglou, K., Malester, B., Xu, J., Tessarollo, L., Rosenbluth, J. and Chao, MV. Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration. *PNAS* 101 5075-5080 (14)
- 20) Chang, PA., Liu, CY., Chen, R and Wu, YJ. Effect of over-expression of neuropathy target esterase on mammalian cell proliferation. *Cell Prolif.* 39, 429-440 (2006)
- 21) Li, Z., Szurek, PF., Jiang, C., Pao, A., Bundy, B., Le, Wei-dong, Bradley, A. and Yu, YE. Neuronal differentiation of NTE-deficient embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330 1103-1109 (2005)
- 22) Chen, J., Xu, L., Mei, J., Yu, X., Kuang, H., Liu, H., Wu, Y. and Wang, J. Involvement 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)
- 23) Paul Glynn NTE: one target protein for different toxic

- syndromes with distinct mechanisms? *BioEssays* 25 742-745 (2003)
- 24) Song, Y., Wang, M., Mao, F., Shao, M., Zhao, B., Song, Z., Shao, C., Gong, Y. Knockdown of Pnpla6 protein results in motor neuron defects in zebrafish. *Disease Models & Mechanisms* 6 404-413 (2013)
- 25) Rainer, S., Bui, M., Mark, E., Thomas, D., Tokarz, D., Ming, L., Delaney, C., Richardson, RJ., Alberts, JW., Matsunami, N., Stevens, J., Coon, H., Leppert, M. and Fink, JK. Neuropathy Target Esterase Gene Mutations Cause Motor Neuron Disease. *The American journal of Human Genetics* 82 780-785 (2008)
- 26) Rainer, S., Albers, JW., Dyck, PJ., Petter Eldevik, O., Wilcock, S., Richardson, RJ., Fink, JK. Motor neuron disease due to neuropathy target esterase gene mutation: Clinical features of the index families. *Muscle Nerve* 43 19-25 (2011)

## 謝辞

この論文をまとめるにあたり、研究室在籍およびOB・OGの方々、導入ベクターの作成にあたっては田中正史研究員、酵素活性測定においては生命科学教育研究支援センターの大久保朋一さん他技術職員の方々、機器使用においては健康科学部松木秀明先生、医学部石井恭正先生にご協力をいただき、心から感謝するものである。なお、本研究は主として文部省科学研究費挑戦的萌芽研究24651064、15K12215および本論文作成にあたっては21K06847の補助を受けた。