

199800364A

厚生科学特別研究事業

ミトコンドリア機能障害によるアルツハイマー病の  
発症機序と予測に関する研究

(H10 - 脳 - 013)

日本医科大学 老人病研究所

太 田 成 男

1 9 9 8

ミトコンドリア機能障害によるアルツハイマー病の発症機序と予測に関する研究

主任研究者 太田 成男 日本医科大学老人病研究所 教授

研究要旨

ミトコンドリア酵素のジヒドロリポアミドサクシニル転移酵素(DLST)遺伝子の多型に基づく遺伝子型とアルツハイマー病の相関関係を生じさせる原因を解明するために、DLST遺伝子解析を詳細におこない、イントロンから転写開始するmRNAをつきとめた。また、アルツハイマー病と相関関係のあるDLST遺伝子型をもつ人はアルツハイマー病患者ではなくても肝障害や血糖値異常があることがわかった。さらに、アルツハイマー病の新規危険因子を検索した。

分担研究者=松田貞幸(鹿屋体育大学教授)、  
三木哲郎(愛媛大学医学部教授)

A. 研究目的

大多数を占める孤発性アルツハイマー病の発症機序を明らかにするには新たな危険因子あるいは引き金となる遺伝子変異を同定し、発症の機序を明らかにすることは社会的な要請に対し急務である。危険因子を明確にすることによって早期診断法を確立することも可能になる。私たちはDLST遺伝子の多型解析からアルツハイマー病の危険因子であると推定した。dihydrolipamide succinyltransferase (DLST)の異常がアルツハイマー病の新しい危険因子であることを確定することが本研究の第一の目的である。そしてDLST遺伝子変異によって生じる神経細胞死のメカニズムを解明してアルツハイマー病の発症過程を明らかにする。さらにそれらの遺伝子変異を持つ人の特徴を明らかにし、アルツハイマー病の発症と生活習慣病の関連を明らかにする。

B. 研究方法

1. 各々の遺伝子型のDLST遺伝子の全塩基配列決定

DLST遺伝子型(ac/ac)をもつアルツハイマー病患者から全長DLST遺伝子をクローニングし、全塩基配列を決定した。別の遺伝子型の塩基配列と比較し、遺伝子型(ac)に特異的な塩基置換をみいだした。DLST(ac)型に特異的な塩基は5つで、アルツハイマー病危険因子の原因塩基候補は5つにしばらくこまれた。これらの遺伝子多型にはいづれもアミノ酸変化を伴う変化は全くなかった。

2. small DLST mRNAの検出

つぎに、DLSTがアルツハイマー病危険因子として働く分子機構の解明を試みた。DLSTは15のエクソンから成り立つが、イントロン7から転写されるmRNAがあり、エクソン8から読み取られる小さなDLST、small DLST、sDLSTが生じることがわかった。これは、蛋白の検出精製、アミノ酸配列の決定、mRNAの転写開始点の同定、

cap構造の付加の確認等によって確定した。DLSTの各々の遺伝子型の遺伝子をラットPC12細胞に導入し、sDLST mRNAの定量を行った。

3. 分子疫学的検討

分子疫学的研究よりアルツハイマー病と相関する遺伝子型(ac/ac)をもつ健常人と特徴も調べた。

600人を対照とし、DLST(ac)をホモあるいはヘテロに持つ人の特徴を検索した。(中部病院長寿医療研究センターの下方部長らとの共同研究)。

4. アルツハイマー病新規危険因子の検討

DLST以外のミトコンドリア蛋白遺伝子とアルツハイマー病との相関関係をさらに調べるため、ミトコンドリア蛋白遺伝子の多型解析を行った。アルツハイマー病患者と健常人の多型の頻度を統計的に比較した。

5. 危険因子候補の検討

$\alpha$ 2-マクログロブリンと $\alpha$ -synuclein遺伝子の多型の頻度を健常人とアルツハイマー病患者で比較して、統計処理を行った。

C. 研究結果

1. DLST遺伝子の多型解析によりDLST遺伝子型(ac/ac)とアルツハイマー病には有意に相関関係があることを先に報告した。その遺伝子多型はアミノ酸変化を伴わない塩基置換であったので、何故DLST遺伝子多型がアルツハイマー病と相関関係があるのかを検討した。まず、DLSTを各々の遺伝子型の人からDLSTをコスミドベクターからクローニングした。さらに、全遺伝子配列を決定し、DLST(ac)に特異的な塩基置換を見出した。

2. イントロン7から転写を開始する短いmRNAが存在することを発見し、ヒト脳から短いDLST遺伝子由来mRNAを検出した。また、その定量法を確立した。この短いDLSTをsmallDLST(sDLST)と呼ぶことにし、sDLST mRNAはDLSTの遺伝子型によって転写効率が違うことをラット培養細胞PC12に遺伝子を導入することによって明らかにした。

3. アルツハイマー病と相関関係の高い

DLST(ac/ac)遺伝子型をもつ健常人の特徴を分子疫学的手法を用いて明らかにした。健常人600人を解析するとDLST(ac)を持つ人は持たない人に比べ、肝障害が大きいこと、心拍排出量が少ないこと、血糖値が高いことなど、DLSTの遺伝子型(ac)によって正常範囲ないでも全身の機能低下が認められた。

4. さらに、ミトコンドリアに局在するアルデヒド脱水素酵素2の遺伝子多型とアルツハイマー病に相関関係があることを明らかにした。 $\alpha$ 2マクログロブリン遺伝子とアルツハイマー病に相関関係があることを確認し、 $\alpha$ -synucleinの遺伝子に欠失変異と女性のアルツハイマー病患者に相関があることを見出した。

#### D. 考察

遺伝子型と疾患の相関関係を調べる結果 (association study) はしばしば、地域差であったり、統計的誤差範囲であったり、その結果が信頼できない場合がしばしば指摘されている。本年度の検索で、アルツハイマー病と相関関係が認められたDLST遺伝子型をもつ健常人にも肝障害が認められたり、血糖値が高いなど遺伝子型に特有の性質が認められたので、DLSTの遺伝子型がアルツハイマー病にも関与していることがより確実になった。また、海外でもDLST遺伝子型とアルツハイマー病が相関関係にあることを示す結果が報告されている。DLST遺伝子の遺伝子型とアルツハイマー病が相関関係があることがより明らかになってきたが、遺伝子型を分類する遺伝子の塩基置換によってアミノ酸変化は生じない。昨年、それを説明する作業仮説として、イントロンから転写されるmRNAを想定し、そのmRNAにより合成される小さな蛋白がアルツハイマー病の発症にかかわっているという作業仮説を提出したが、そのmRNAの存在が実証された。さらにこの小さな蛋白の果たす役割を明らかにする必要がある。

#### E. 結論

DLSTがアルツハイマー病の危険因子である可能性が一段と高まり、その分子機構も解明しつつある。

#### F. 研究発表

##### 1. 発表論文

1) Kamino, K., Wijsman, E., Anderson, L., Nemens, E., Yamagata, H., Ohta, S., Bird, T.D., Schellenberg, G.D. : A family with late-onset Alzheimer's disease carrying Val91Met mutation of apolipoprotein A-II gene suggests altered plasma lipid metabolism in Alzheimer's disease. In: Alzheimer's disease &

related disorders, edited by K. Iqbal, D.F.Swaab, B.Winblad and H.M.Wisniewski. John Wiley & Sons., in press. (1999).

- 2) Ito, S., Ohta, S., Nishimaki, K., Kagawa, Y., Miyazaki, R., Kuno, S-Y., Komatsuzaki, Y., Mizusawa, H. and Hayashi J-I. : Functional integrity of mitochondrial genomes in human platelets and autopsied brain tissues from elderly patients with Alzheimer's disease. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., in press. (1999).
- 3) Kamino, K., Yoshiiwa, A., Nishiwaki, Y., Sato, N., Tateishi, K., Kudo, T., Nishimura, T., Takeda, M., Miki, T., Ogihara, T. : Integration of genetic factors into pathogenesis of Alzheimer's disease. Research and Practice in Alzheimer's disease., 51-70. (1998).
- 4) Yasukawa, T., Suzuki, T., Ueda, T., Hayashi, J-I., Ohta, S. and Watanabe K. : Stability of mitochondrial tRNA molecules with pathogenic point mutations. Nucleic Acids Symposium Series., 39, 257-258. (1998).
- 5) Asoh, S., Nishimaki, K., Nanbu-Wakao, R., Ohta S. : A trace amount of the human proapoptotic factor Bax induces bacterial death accompanied by damage of DNA. J Biol Chem., 273, 11384-11391. (1998).
- 6) Okazaki, M., Ishibashi, Y., Asoh, S., Ohta, S. : Overexpressed mitochondrial Hinge protein, a cytochrome c binding protein accelerates apoptosis by enhancing the release of cytochrome c from mitochondria. Biochem Biophys Res Commun., 243, 131-136. (1998).
- 7) Ishibashi, Y., Nishimaki, K., Asoh, S., Nanbu-Wakao, R., Yamada, T., Ohta, S. : Pore formation Domain of human pro-apoptotic Bax induces mammalian apoptosis as well as bacterial death without antagonizing anti-apoptotic factors. Biochem Biophys Res Commun., 245, 609-616. (1998).
- 8) 太田成男 : アポトーシスにおけるミトコンドリアの関与。「臓器別アポトーシス証明法」(大概勝紀、小路武彦、渡辺慶一編集) 南江堂 印刷中 (1999).
- 9) 太田成男、石橋佳朋 : アポトーシスの分子機構。「脳と発達」日本小児神経学会. 31: 122-128. (1999).
- 10) 有富正治, 太田成男 : アポトーシス関連蛋白質の構造生物学—TNF関連、Fas関連、Bcl-2ファミリーおよびカスパーゼファミリー蛋白質の構造解析の現状。「構造生物学のフロンティア

- ーシグナル伝達とDNAトランスアクション」  
「蛋白質 核酸 酵素」増刊号,共立出版  
44(4):395-403. (1999).
- 11)太田成男: Alzheimer病とミトコンドリア「Annual Review神経」中外医学社. 237-243. (1999).
- 12)麻生定光, 太田成男: ミトコンドリア障害とアポトーシス. 「アポトーシスと疾患—中枢神経疾患編」(水野美邦編集) 医薬ジャーナル. 印刷中 (1998).
- 13)太田成男: 疾病とアポトーシス. 「図説 分子病態学」(市ノ瀬白帝, 鈴木宏治編集) 中外医学社. 53-56. (1998).
- 14)Ohta S: Pore-Forming Structure and Bifunction of the Pro-Apoptotic Factor, Bax.in` Apoptosis: its roles and mechanism(Yamada,T.&Hashimoto,T,eds. Business Center for Academic Societies Japan) 65-84. (1998).
- 14)太田成男: Alzheimer病とミトコンドリア異常. Annual Reviw「神経—変性疾患」(後藤文男, 高倉公朋, 木下真男, 柳澤信夫, 清水輝男編集) 中外医学社 237-243. (1998).
- 15)麻生定光, 太田成男: アポトーシスと癌治療. 医薬ジャーナル 34: 93-104. (1998).
- 16)太田成男: ミトコンドリア病. 「臨床化学」(ミトコンドリア特集) 12: 180-190. (1998).
- 4) Ohta S., Asoh S., Kamino K., Ishibashi Y., Nishimaki K., Takase C., Nakano ,K. and Matsuda, S.: Genetic Association of Alzheimer's Disease with the Nuclear Gene Encoding DLST of the Mitochondrial  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex. Gordon Research Conference Mitochondria and Chloroplasts, 1998;9.13-18. ( Les Diablerets, Switzerland)
- 5)Ohta, S., Nishimaki, K., Tanaka, R., Ishibashi, Y., Asoh, S.: Bacterial cell death induced by the proapoptotic factor Bax is suppressed by mutations in the ATP synthase gene. IBC's Fifth Annual Conference on Apoptosis, 1998.12. (San Francisco).
- 6) Asoh, S., Mori, T., Ohta, S.: Mitochondrial dysfunction enhances the Fas expression. IBC's Fifth Annual Conference on Apoptosis, 1998.12. (San Francisco).
- 7) Takahashi T, Asoh S, Azuma A, Abe S, Miyamoto H, Enomoto T, Hashimoto Y, Ohara K, Ohta S, Kudoh S: Strongly expressed Bcl-2 protein in BALF cells prepared from sarcoidosis patients. American Thoracic Society. 1998 International Conference (Chicago), 1998. 4.
- 8)Takahashi T, Asoh S, Azuma A, Abe S, Miyamoto H, Enomoto T, Hashimoto Y, Ohara K, Ohta S, Kudoh S: The expression of Bcl-2 in BALF cells prepared from sarcoidosis patients. 6th International Conference on Bronchoalveolar Lavage (Corfu, Greece), 1998. 6.
- 9) 西槇貴代美, 麻生定光, 表弘志, 二井将光<sup>1)</sup>, 太田成男: Bax蛋白による大腸菌の致死作用や大腸菌のATP合成強訴の変異によって抑制される. アポトーシス研究会第7回研究集団会, 1998.8.20. 東京大学山上会館.
- 10) 田中理絵, 石橋佳朋, 太田成男: BaxおよびBH3、BH1領域を欠くBax (112-192) のよるアポトーシス. アポトーシス研究会第7回研究集団会, 1998.8.20. 東京大学山上会館.
- 11) 山口 貴, 平岡美紀, 大原国俊, 西槇貴代美, 太田成男, 鈴木康之: ウサギ眼組織におけるwater channel protein. 日本眼薬理学会, 1998.9.
- 12) 安川武宏, 鈴木勉, 上田卓也, 林純一, 太田成男, 渡辺公綱: ミトコンドリア病患者由来変異tRNAの安定性. 第25回核酸化学シンポジウム, 1998, 9.
- 13) 高瀬千義, 中野恭子, 中河志朗, 太田成男, 松田貞幸: 脳・骨格筋に分子量の小さいジヒドロリポアミド・サクシニル転移酵素が存在する. 第71回日本生化学会大会, 1998.10.

## 2.学会発表

- 1) Kamino K., Wijsman E., Anderson L., Nemens E., Yamagata H., Ohta S., Bird T.D., Schellneberg G.D: A family with late-onset Alzheimer's disease carrying Val91Met mutation of apolipoprotein A-II gene. 6th International Conference on Alzheimer's disease and related disorders, 1998.7. (Amsterdam).
- 2) Ohta S., Asoh S., Kamino K., Ishibashi Y., Nishimaki K., Takase C., Nakano K. and Matsuda S.: Genetic Association of Alzheimer's Disease with the Nuclear Gene Encoding DLST of the Mitochondrial  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex. Mitochondrial Dysfunction in Human Pathology, 1998.9. (Melbourne).
- 3) Yasukawa T., Suzuki T., Ueda T., Nishimaki K., Watanabe K., and Ohta,S.: Abnormalities in stability and aminoacylation of the mutant mitochondrial tRNAIle molecule derived from a patient with fatal cardiomyopathy. Mitochondrial Dysfunction in Human Pathology, 1998.9 (Melbourne).

- 14) 横田恵理子, 園田よし, 太田成男, 笠原 忠:  
アラキドン酸リポキシゲナーゼ阻害剤で誘導される  
アポトーシスにおけるcaspase活性化とBcl-2ファミ  
リータンパク質. 第71回日本生化学会大会,  
1998.10.
- 15) 麻生定光, 若尾りか, 西槇貴代美, 田中理絵,  
太田成男: アポトーシス促進因子ヒトBax耐性を付  
与する大腸菌RNaseEのN末端半分のペプチドの発現  
は活性酸素の産生を抑制する. 第21回日本分子生  
物学年会98.12.名古屋
- 16) 西槇貴代美, 麻生定光, 表弘志, 二井将光, 太  
田成男: Bax蛋白による大腸菌の致死作用は大  
腸菌のATP合成酵素の変異のよって抑制される.  
第21回日本分子生物学年会, 98.12.横浜
- 17) 田中理絵, 石橋佳朋, 太田成男: Baxおよび  
BH3, BH1領域を欠くBax (112-192) によるア  
ポトーシス誘導活性. 第21回日本分子生物学年  
会, 98.12.16-19.横浜
- 18) 麻生定光, 若尾りか, 西槇喜貴代美, 田中理  
絵, 太田成男: アポトーシス促進因子ヒトBax耐  
性を付与する大腸菌RNaseEのN末端半分のペプ  
チドの発現は活性酸素の産生を抑制する. 第21  
回日本分子生物学年会, 98.12.16-19.横浜
- 19) 安川武宏, 鈴木勉, 上田卓也, 太田成男, 渡  
辺公綱: 乳幼児致死性心筋症患者由来点変異を持  
つミトコンドリアtRNAIleはアミノアシル化の効  
率が低い. 第21回日本分子生物学年会,  
98.12.16-19.横浜

アルツハイマー病の疾患感受性遺伝子に関する研究

分担研究者 三木哲郎 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

アルツハイマー病の疾患感受性遺伝子を調べるため、遺伝子多型を用いて case-control studyを行った結果、 $\alpha$ -synuclein 遺伝子あるいは近傍の遺伝子が女性特異的な危険因子となっている事が示唆された。

A.研究目的

我々は多因子遺伝性疾患であるアルツハイマー病 (AD) の原因遺伝子を研究している。ADには家族性のものであるが非常に少ない。家族性ADの場合、アミロイド前駆体蛋白質 (APP)、プレセニリン (PS1,PS2) などの原因遺伝子が発見され、次の段階である蛋白機能を解析する細胞生物学的な研究へ進んでいる。しかし、大部分のADは65歳以上で発症する晩期発症型の、家族歴のない孤発例である。現在、日本には晩期発症型孤発性ADの患者数は40~50万人と考えられ、その発症の危険因子として最大の影響力を持つ遺伝因子はアポリポ蛋白E (APOE) である。しかしAPOE4を持っているからといって必ずしもADを発症するわけではなく、多くの環境因子、遺伝因子が関与していると推測されるがまだ不明な点が多い。我々の研究の最終目的は、AD (主として晩期発症型孤発性AD) の原因遺伝子の同定である。

今回、AD発症の候補遺伝子として、アミロイドの構成要素の1つ $\alpha$ -synuclein 遺伝子について検討を行った。

B.研究方法

対象：AD患者集団は、NINCDS-ADRDAの診断基準に基づく、晩期発症型孤発性AD患者および早期発症型孤発性AD患者である。健常者は年齢と性を一致させた健常老年者の集団である。

解析した遺伝子： $\alpha$ -synuclein 遺伝子の多型を用いた。まず $\alpha$ -synuclein 遺伝子に関しては全ゲノムにわたってPCR-DGGE 法にて変異あるいは多型のスクリーニングを行い、イントロン3に2塩基 (CT) の挿入(I)/欠失(D)多型を見出した。日本人一般集団においてI アレルは0.4、D アレルは0.6 の遺伝子頻度である事が判明したため、アルツハイマー病患者180名と高齢健康者143名との間でその遺伝子頻度をPCR-RFLP法にて検出し、 $\alpha$ -synuclein 遺伝子とADとの関連性を調べた。比較検討に対してはAPOE4との相乗効果の有無についてもチェックした。

C.研究結果

AD群、高齢健常者群とも遺伝子頻度の分布はHardy-Weinbergの法則に従っていた。また2群間に

有意差は認めず、APOE4の有無でも有意差は認めなかった。しかし、性別にみると女性健常高齢者にII型が有意に多かった ( $p < 0.01$ ) ため、Dアレルを危険因子としてとらえ、APOE4および $\alpha$ -synuclein Dの有無を4つのカテゴリーに分け、男女別に比較してオッズ比をとると、予想通りAPOE4は男女共オッズ比の上昇がみられたが、男性ではDアレルの有無でオッズ比は変わらなかった。しかし女性でAPOE4(+ )かつD(-)のオッズ比は5.4 (95%信頼限界は1.8-16.0)で、APOE4(+ )かつD(+ )のオッズ比は14.8 (95%信頼限界は5.4-40.8) と高値であった。これは $\alpha$ -synuclein 遺伝子あるいは近傍の遺伝子が女性特異的な危険因子となっている事を示唆している。

D.考察

$\alpha$ -synucleinは最初 $\beta$ アミロイドの少数成分として発見され、後に一部の常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子として認識され、またLewy小体の構成成分である事がわかっている。これまでADにおいて本遺伝子の遺伝子変異は見出されていないが、プロモーター領域にある繰り返し多型との関連性について議論されてきており、ADとの関連があるとするデータと関連がないとするデータがあり、まだ結論は出ていない。今回われわれは新たな遺伝子多型をイントロン3領域に見出し、ADとの関連性について検討したが女性にのみ欠失多型がリスクである結果が出た。この結果は集団を変えて再確認されねばならないが、もし多くの集団で事実であれば $\alpha$ -synuclein 遺伝子あるいはその近傍のゲノムについて精力的に調べる必要性がでてくると思われる。

E.結論

アルツハイマー病の疾患感受性遺伝子を調べるため、遺伝子多型を用いてcase-control studyを行った結果、 $\alpha$ -synuclein 遺伝子あるいは近傍の遺伝子が女性特異的な危険因子となっている事が示唆された。

F.研究発表

1. 論文発表

1. Nishiwaki, Y., Kamino, K., Yoshiiwa, A., Sato, N., Tateishi, K., Takeda, M., Kobayashi, T., Yamamoto, H., Nonomura, Y., Yoneda, H., Sakai, T., Imagawa, M.,

- Miki, T., and Ogihara, T. : T/G polymorphism at intron 9 of presenilin 1 gene is associated with, but not responsible for sporadic late-onset Alzheimer's disease in Japanese population. *Neurosci. Lett.*227: 123-126 (1997)
2. Kamino, K., Yoshiiwa, A., Nishiwaki, Y., Sato, N., Tateishi, K., Kudo, T., Nishimura, T., Takeda, M., Miki, T., and Ogihara, T.:Integration of genetic factors into pathogenesis of Alzheimer's disease. In *Research and Practice in Alzheimer's disease*. p.51-70, Vellas B et al. eds. Serdi Publisher, Paris (1998)
2. 学会発表
1. Yoshiiwa A, Kamino K, Ueda Y, Hatanaka Y, Mitsuda N, Sato N, Yamamoto H, Kobayashi T, Miki T and Ogihara T. : Association study of late-onset Alzheimer's disease and apolipoprotein AI, B, CI and E. 6th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Jul 18-23, 1998, Amsterdam, Netherlands.
2. Sato N, Kamino K, Mitsuda N, Hatanaka Y, Nishiwaki-Ueda Y, Yoshiiwa A, Miki T. and Ogihara T. :Amyloid  $\beta$  protein (1-40)-induced CREB phosphorylation: A possible mechanism responsible for memory loss in Alzheimer's disease. 28th Annual Meeting Society for Neuroscience. Nov 7-12, 1998, Los Angeles, U.S.A.
3. 山縣英久、松原美穂、三木哲郎、近藤郁子 ; アルツハイマー病における  $\alpha$ -synuclein 遺伝子多型の分布. 第43回日本人類遺伝学会 1998.10.14-16.甲府
4. 松原美穂、山縣英久、小原克彦、三木哲郎、近藤郁子 ; アルツハイマー病における  $\alpha$ -synuclein 遺伝子多型の分布. 第96回日本内科学会総会 1999.3.31. 東京

ミトコンドリア機能障害によるアルツハイマー病の発症機序と予測に関する研究  
S.DLSTとアルツハイマー病

分担研究者 松田貞幸 鹿屋体育大学 教授

研究要旨

ジヒドロリポアミドサクシニル転移酵素 (DLST) の (ac/ac) 遺伝子型はアルツハイマー病発症の原因の一つであること、②DLST遺伝子には選択的スプライシング、あるいはイントロン中にプロモーターが出現することによって低分子量のDLST(S.DLST)が出現することを明らかにした。このS.DLSTによるアルツハイマー病の発症の原因である可能性が強い作業仮説を提出した。

A. 研究目的

最近、私たちは、ミトコンドリア酵素である $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体の構成酵素であるジヒドロリポアミド・サクシニル転移酵素 (DLST) 遺伝子の特定の遺伝子型が極めて有意にアルツハイマー病患者に見いだされることを発見した。これはアルツハイマー病患者251名と健常者452名を調べることによって判明したものである。この事実はDLSTの特定の遺伝子型は他の遺伝子型と異なり、何らかの理由によりアルツハイマー病を発症させるものと理解される。そこで本研究の目的はDLST遺伝子の特定の遺伝子型がどのようにしてアルツハイマー病を発症させるのかを明らかにすることである。

B. 研究方法

ラット及びヒト脳、骨格筋を用いてタンパク化学的及び免疫組織染色を行うことによって分子量の低いDLST (S・DLST) の存在を明らかにする。更に、Cap site cDNAライブラリーよりこれらのS・DLSTをコードするcDNAを単離し、その存在を証明する。

C. 研究結果

DLST遺伝子には6種類の遺伝子型があるが、このうちの (ac/ac) 型と名付けた遺伝子型のみがアルツハイマー病患者群に高い頻度で見い出される。(ac/ac) 型と言えども、他のDLST遺伝子型とアミノ酸の変化は見られなかった。従って、選択的スプライシング異常か、イントロン中にプロモーターが出現するか、遺伝子発現に関わる変化が発症の原因であると考えられる。その可能性の一つである選択的スプライシング異常に注目してアルツハイマー病発症とDLST遺伝子との関わりを明らかにしようとするものである。結果を要約すると以下の如くである。

1. 脳、骨格筋に分子量の低いDLST (Small・DLST S-DLST) が存在する。
2. 脳においては、S・DLSTの細胞内局在は不明であるが、骨格筋においては、S.DLSTは細胞膜に存在し、加齢とともに増加する。
3. 脳、骨格筋よりDLSTのイントロンから転写されるmRNAに対応するcDNAを単離した。

4. このmRNAの存在は、RNase protection 解析、primer extension 解析によって確認された。このmRNAはS.DLSTをコードするのに十分な情報を保持していた。

5. S. DLSTをコードするmRNAはcap構造を持たず、その5' 非翻訳配列は、internal ribosome entryによる転写開始機構による転写条件を満たす配列を保持していることが示唆された。

D. 考察

以上の結果から脳、骨格筋に存在するS. DLSTをコードするmRNAは、DLST遺伝子のイントロン7から転写されることが明らかとなった、このmRNAには、cap構造はなく、internal ribosome entry 機構によって、転写される可能性が示唆された。これらの研究のなかで、大変興味あることは、一ケの遺伝子の中で、二種類のmRNAが転写され、全く機能の異なった二種類のタンパク質が合成されるということである。我々の知る範囲内では、真核生物においてはこのようなことは知られていない。また、このイントロン7から転写されるmRNAが、遺伝子型 (ac/ac) の特徴づけになり、このタイプの人が、S. DLSTの蓄積をもたらし、アルツハイマー病の発症の原因になる可能性が高いと考えられた。今後は、このイントロン7の近辺には (ac/) 型に特異的な塩基置換があるので、他の遺伝子型とて遺伝子発現量を比較する必要がある。また、S. DLST-mRNAのin vitroタンパク質合成と、in situ hybridization解析を行うことによって、S. DLST-mRNAの細胞室内存在と確認することも必要である。

E. 結論

脳、骨格筋に分子量の低いDLST (S・DLST) が存在し、脳においてはS・DLSTは細胞内局在は不明であるが、骨格筋においてはS・DLSTは細胞膜に存在し、加齢とともに増加する。これらのS・DLSTはDLST遺伝子のイントロン7から転写されることが判明した。このことがDLSTによるアルツハイマー病の特定の遺伝子型 (ac/ac) をイントロン7から転写されるmRNAの発現に関連づけることが可能となり、その発現量の違いが発症の原因である。



F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakano K., Ohta S., Nishimaki K., Miki T., Matuda S.: Alzheimer's disease and DLST genotype. *Lancet*, 350, 1367-1368 (1997)

2. Matuda S., Kodama J., Goshi N., Takase C., Nakano K., Nakagawa S., Ohta S.: A Polypeptide Derived from Mitochondrial Dihydrolipoamide Succinyltransferase Is Located on the Plasma Membrane in Skeletal Muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241, 151-156 (1997)

2. 学会発表

1. 中野恭子, 太田成男, 高瀬千義, 西槇貴代美, 麻生定光, 北村伸, 赫彰郎, 紙野晃人, 吉岩葵, 三木哲郎, 中河志郎, 松田貞幸 : 孤発型アルツハイマー病はジヒドロリポアミド・サクシニル転移酵素遺伝子の多型と有意に相関 (associate) する  
第20回日本分子生物学会年会 (1997)

2. Ohta S., Nakano K., Miki T., Matuda S.: Genetic association of Alzheimer's disease with the nuclear and mitochondrial genes encoding mitochondrial proteins COE International Symposium on Alzheimer's Disease (1998)

