

能異常が細胞にもたらす酸化ストレスを評価した。細胞内 ROS のほとんどはミトコンドリアから漏出している。すなわち、酸化的リン酸化系における代謝される酸素分子の数が細胞障害性の強い活性酸素種となる。そこで呼吸鎖機能を持つミトコンドリアにおける ROS 産生量を H<sub>2</sub>DCFDA を用いて測定し、酸化ストレスの評価指標とした。H<sub>2</sub>DCFDA は細胞内に取り込まれ H<sub>2</sub>DCF となり、これが細胞内の ROS によって酸化され蛍光物質 DCF となる。この DCF の蛍光強度が細胞内 ROS の産生量を反映することを利用し、各細胞株における細胞内 ROS の発生量を解析した。同時に各細胞株において、ミトコンドリアに対する特異的な蛍光色素 MitoTracker Orange CMTMRos がミトコンドリア機能（膜電位）依存性の蛍光を発することを利用し、各細胞株における呼吸鎖機能を持つミトコンドリアの量を解析した。

各細胞株におけるフローサイトメトリーを用いた測定では、コントロール 2SA に比べ、MELAS 由来サイブリッドである、変異 mtDNA を多く含みこれによってミトコンドリア機能の低下した細胞株 2SD と 59A においては、機能を保持しているミトコンドリアあたりの細胞内 ROS の産生量が 1.5 ないし 2 倍に増大していた。

脂質過酸化の副産物によって修飾された蛋白質の細胞内局在を明らかにするために、

抗 HNE 抗体および抗 HEL 抗体を用いて Western blot 分析を行った。その結果、抗 HNE 抗体によって、細胞質画分においては 53 kDa, 43 kDa, 33 kDa の 3 種の蛋白質が、ミトコンドリア画分においては 53 kDa と 43 kDa の 2 種の蛋白質が検出された。しかし、マイクロゾーム画分や核画分では HNE 修飾蛋白質は検出されなかった。コントロール 2SA に比べ、サイブリッド 2SD と 59A では、細胞質画分およびミトコンドリア画分においてこれらの HNE 修飾蛋白質の著明な増加が認められた。

抗 HEL 抗体を用いた Immunoblot では、細胞質画分には 53 kDa, 48 kDa, 46 kDa, 43 kDa の 4 種の蛋白質が、ミトコンドリア画分においては 65 kDa と 51 kDa の 2 種の蛋白質が検出された。これに対し、マイクロゾーム画分や核画分ではヘキサノニル化された蛋白質が見いだされなかった。コントロール 2SA に比べ、サイブリッド 2SD と 59A の細胞質画分においてはヘキサノニル化された蛋白質の著明な増加を認めなかった。これに対して、ミトコンドリア画分においてはヘキサノニル化された蛋白質が明らかに増加していた。

更にミトコンドリア画分におけるヘキサノニル化された蛋白質の増加はミトコンドリアのどの部分に存在するかを確定するため、ミトコンドリア画分をミトコンドリア膜画分、ミトコンドリア可溶性画分および

マイトプラスト画分に分離し、免疫学的に検討した。その結果、ヘキサノニル化された蛋白質が主にミトコンドリア内膜に局在することが示された。

Immunocytochemistry では、抗 HEL 抗体を使って ABC 法で細胞を免疫染色した場合には、核を除き、細胞質内の多数の小器官が顆粒状あるいは線維状に染色された。コントロール 2SA に比べ、サイブリッド 2SD と 59A においては HEL 染色強度が明らかに増強した。一方、抗 HNE 抗体を用いた免疫染色では、各細胞株における HNE 染色が非常に弱く、比較検討することができなかった。その原因は HNE によって修飾されたアミノ酸残基がおそらく蛋白質構造の内部に存在するために、抗 HNE 抗体と結合しにくいのであろうと推定された。

抗 HEL 抗体によって染色された細胞器官がミトコンドリアであるか否かを検討するために、ミトコンドリアに対する特異的な蛍光色素 MitoTracker Red CMXRos と抗 HEL 抗体を用いた二重染色法によって、ヘキサノニル化された蛋白質の細胞内局在を検討した。操作手順として、まずミトコンドリアに対する特異的な蛍光色素 MitoTracker Red CMXRos を用いて細胞を染色した。細胞を固定した後、抗 HEL 抗体を使って免疫染色し、FITC 標識した二次抗体を使用し、細胞内におけるヘキサノニル化された蛋白質をその蛍光で検出した。

各細胞株における蛍光顕微鏡を用いた観察によって、細胞内で主としてヘキサノニル化された蛋白質の局在する細胞器官がミトコンドリアであることが示された。細胞質画分のヘキサノニル化された蛋白質が Immunocytochemistry で検出されなかったことは、おそらく HEL が蛋白質構造の内部にあり、抗体によって認識されないためと推定された。

#### D. 考察

本研究において、mtDNA 変異を有する細胞におけるミトコンドリアからの ROS 産生、細胞内の脂質の過酸化および細胞内器官の過酸化脂質による蛋白質の酸化的修飾を総合的に分析した。その結果、変異 mtDNA によるミトコンドリア機能異常が引き金となり、ミトコンドリアからの活性酸素種の産生が増加し、これによって細胞内脂質の過酸化が加速され、その結果生じた過酸化脂質がミトコンドリアの蛋白質だけではなく、他の細胞内器官の蛋白質をも修飾することが証明された。これらの要素が複合的に作用し、細胞機能の障害や細胞死を誘導していることが示唆された。これらの機序は、ミトコンドリア脳筋症だけではなく、パーキンソン病やアルツハイマー病などミトコンドリア機能異常に基づく病態においても関与していると推定され、将来の治療法を確立する上で新しい指針を示すものと

考えられる。

## E. 結論

ミトコンドリア機能異常を有する細胞では、脂質過酸化が加速され、脂質過酸化反応の副産物が特にミトコンドリア内膜の蛋白質を修飾し、細胞機能の障害や細胞死を誘導している可能性が示された。今後、ミトコンドリアにおける HNE によって修飾された蛋白質あるいはヘキサノニル化された蛋白質が、電子伝達系複合体のどのサブユニットに対応するか、さらにミトコンドリア機能異常を有する患者の筋あるいは脳組織において HNE あるいは HEL に関連する脂質と蛋白質の変化を検討する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Borgeld, H.-J. W., Naruse, K., Nishikawa, S.-i., Zhang, J., Kikuchi, A., Furukawa, K., Yagi, K., and Tanaka, M. Appropriately spaced nuclear localizing signals are necessary for efficient nuclear import of non-nuclear proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256: 278-283, 1999
- 2) Kita, K., Tsuda, J., Kato, T., Okamoto, K., Yanase, H., and

Tanaka, M. Evidence of horizontal transfer of the *EcoO109I* restriction-modification gene to *Escherichia coli* chromosomal DNA. *J. Bacteriol.* 181: 6822-6827, 1999

- 3) Miura, J., Uchigata, Y., Gong, J.-S., Zhang, J., Iwamoto, Y., Yagi, K., and Tanaka, M. Mitochondrial genotype Mt5187C is associated with diabetic nephropathy in Japanese type-1 diabetic patients. *Proceedings of the 10th Japan/Korea Symposium on Diabetes Mellitus* (Shichiri, M., Shinn, S. H., and Hotta, N., Eds.) Elsevier Science, Amsterdam, 2000 (in press)
  - 4) 田中雅嗣 長寿に関連するミトコンドリア遺伝子型と成人発症性疾患への影響 *最新医学* 54: 1122-1128, 1999
  - 5) 田中雅嗣 ミトコンドリアと老化 脳と神経 51: 589-599, 1999
  - 6) 田中雅嗣 ミトコンドリアと活性酸素 *Clinical Neuroscience* 17: 384-349, 1999
  - 7) 田中雅嗣 ミトコンドリア遺伝子異常と心筋症 *循環器Today* 1: 866-219, 1999
  - 8) 田中雅嗣 ミトコンドリアと老化 *BIO Clinica* 15: 214-219, 2000
- ### 2. 学会発表

- 1) 高木克昌、曾根孝仁、坪井英之、近藤純一郎、武川博昭、神谷宏樹、Gong Jian-Sheng、Zhang Jin、田中雅嗣 ミトコンドリア遺伝子ホモプラスミー変異による重症心筋症の遺伝子解析 第63回日本循環器学会総会・学術集会 1999年3月27-29日 東京
- 2) 申偉秀、鈴木順一、柳沢昭彦、杉浦清了、中島敏明、天野恵子、住野清一、坂本二哉、豊岡照彦、田中雅嗣、Gong Jian-Sheng、Zhang Jin、高沢謙二、坂口康弘 成人発症性疾患あるいは長寿に関連するミトコンドリア遺伝子型が心筋梗塞の発症に及ぼす影響 第63回日本循環器学会総会・学術集会 1999年3月27-29日 東京
- 3) 田中雅嗣 長寿あるいは成人発症性疾患に関連するミトコンドリア遺伝子型 第46回日本臨床化学会 夏期セミナー シンポジウム 1999年7月28-29日 広島
- 4) 田中雅嗣 ミトコンドリアからのメッセージ 長寿に関連するミトコンドリア遺伝子型と成人発症性疾患 日本農芸化学会平成11年度中部支部・関西支部合同大会およびシンポジウム 1999年10月1-2日 岐阜
- 5) 田中雅嗣 長寿に関連するミトコンドリア遺伝子型と成人発症性疾患 第72回日本生化学会大会 シンポジウム 1999年10月6-9日 横浜
- 6) Gong Jian-Sheng、後藤雄一、宮林重明、佐橋 功、八木國夫、田中雅嗣 長寿に関連するミトコンドリア遺伝子型 Mt5178Aはミトコンドリア病の病因となる変異の発生を抑制する 第72回日本生化学会大会1999年10月6-9日 横浜
- 7) Harm-Jan W. Borgeld、菊池韶彦、古川鋼一、八木國夫、田中雅嗣 Generation of rho minus *S. cerevisiae* by *EcoRI* targeted into mitochondria 第72回日本生化学会大会1999年10月6-9日 横浜
- 8) 喜多恵子、津田順子、岡本賢治、柳瀬英司、田中雅嗣 大腸菌H709c株染色体DNA上におけるII型制限修飾酵素遺伝子とP4ファージ遺伝子群の連鎖について 第72回日本生化学会大会1999年10月6-9日 横浜
- 9) 田中雅嗣 遺伝子からみた子供の健康 第46回日本学校保健学会 教育講演 1999年11月27-29日 名古屋
- 10) Tanaka M, Yagi K: Mutations and polymorphisms of mitochondrial DNA in diseases and aging. The 4th Japanese-Poland Seminar on Biotechnology "Advances in Biochemical Assay for Diagnostic Medicine" October 26, 1999, Gifu,

Japan

- 11) Tanaka M: Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis.

The Fourth International NILS Workshop on Longevity Sciences  
“Interventions: Part II” December 3-4, 1999, Obu, Japan

- 12) Tanaka M, Gong J-S, Zhang J, Yagi K:

Mutations and polymorphisms of mitochondrial DNA in

cardiomyopathy. Cardiomyopathy

2000: The 7th Antwerp-La Jolla-

Kyoto Research Conference on

Cardiac Function, February 24-26,

Kyoto, Japan

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究者 パーキンソン病患者における酸化ストレス

服部信孝 順天堂大学医学部脳神経内科

パーキンソン病（PD）における酸化ストレスマーカーである 8-oxo-dGTP(8-oxio-dioxyguanosine)の scavenger enzyme である 8-oxo-dGTPase (MTH1)について剖検脳を用いて検討した。また予後判定マーカーの検討として PD 各 stage について尿中 8-OHdG(8-hydroxyguanosine)を測定した。MTH1 は PD の黒質神経細胞のみで上昇していた。免疫組織化学的検討でも強陽性を示していた。また 8-OHdG に対する immunoreactivity も PD において強陽性を示していた。fractionatin の検討では mitochondria にて数倍上昇しており主に mitochondria で上昇していると考えられた。PD の黒質神経細胞では mitochondria にて酸化ストレスが生じていると考えられた。一方、尿中 8-OHdG は stage の増悪に従い高値を示す傾向にあり、stage marker になりうると考えられた。また disease control として Multiple System Atrophy (MSA)について検討したが高値を示す症例は存在せず尿中マーカーは疾患特異性の高いマーカーになりうることが明らかにされた。

A. 研究目的

孤発型パーキンソン病 (PD)の原因は、現在のところミトコンドリア機能障害、酸化ストレス、神経毒、遺伝的素因の関与が指摘されている。PD における酸化ストレスの関与は、鉄の沈着やMDAの上昇など酸化ストレスの関与を示す報告は多い。我々も脂質過酸化の代謝産物である Hydroxy-4-nonenal (HNE)が黒質神経細胞で上昇

していることを確認している。HNE 陽性細胞が黒質神経細胞に蓄積していることは証明できたが、hot spot となる蛋白が何かは解っていない。DNA レベルでも、DNA 損傷のマーカーである 8-OHdGが黒質神経細胞で上昇していることが報告されている。主に mtDNA で上昇していることが指摘されているが詳細な study は我々の知る限り見あたらない。蛋白レベルでも

DNA レベルでも酸化ストレスマーカーの上昇が指摘されているが、その機序については十分な解明されていない。そこで我々は神経細胞が分裂終了細胞であることに着目し、8-OHdG 源になる 8-oxo-dGTP の scavenger enzyme である 8-oxo-dGTPase (MTH1) について検討した。また PD では PD の予後判定ないし疾患特異性マーカーは存在しない。PD の発症機序にミトコンドリア電子伝達系複合体 I 活性低下及び酸化ストレスの関与は明らかと考えるが、骨格筋をはじめ様々な臓器でミトコンドリア電子伝達系複合体 I の活性低下の報告は PD が全身性疾患であることを意味している。しかしながら、この活性低下の程度は軽微であり、一次的低下ではなく二次的低下と考えるのが妥当と思われる。おそらく何らかの要因で活性低下が生じたと考える。そこで我々は全身性の酸化ストレスマーカーになりうる尿中 8-OHdG を PD の各 stage について測定した。

#### B. 研究方法

MTH1: 神経病理学的に PD と診断されている剖検脳 6 例, MSA と診断された 3 例, 正常対照として 4 例を検討した。パラフィン包埋切片を用いて抗 MTH1 抗体を一次抗体として ABC 法にて発色した。更に 8-OHdG の抗体を用いて連続切片にて検討した。また同一症例の凍結脳の黒質を punch out して homogenate 70 mg を western blotting にて解析した。positive control として MR51 HeLa cell を用いた (MTH1 が

transfection されている stable cell line)。尿中 8-OHdG: 対象は PD 38 例, 正常対照 21 例, 多系統委縮症 2 例。PD の臨床診断は, Dr. Calne が提唱している診断基準を用いた。尿中 8-OHdG (ng/ml) を ELISA 法にて測定。ELISA 法は, 日本油脂が開発した kit を用いた。採尿は, stage 分類での比較ができるよう外来患者でも可能な午前の随時尿を用いた。また糸球体濾過量を補正するため尿中クレアチニン (mg/dl) を測定した。

#### C. 研究結果

MTH1: PD においてのみ MTH1 に対し immunoreactivity を認めた。western blotting でも PD においてのみ陽性 band を認めた。一方, 正常対照, MSA では染色性も陽性 band も認めなかった。fractionation では mitochondrial fraction にて positive control として用いた MR51 と比較して数倍上昇しており, 主に mitochondria で MTH1 が上昇していると考えられた。尿中 8-OHdG: 正常 40 才代 10.16, 正常 50 才代 10.8, 正常 60 才代 10.8 加齢による変化では 40 才代と 50 才代では 5% の有意差を認めず, 同様に 50 才代と 60 才代では有意差を認めなかった。しかし 40 才代と 60 才代を比較すると 5% の有意差を認め加齢による酸化ストレスの関与が考えられた。一方 PD では, stage I 14.9, stage II 23.4, stage III 30.4, stage 36.8, stage 20.8 の平均値を示し, それぞれの stage を正常 60 才代と比べると stage I では有意差を認めないが, stage II, III, IV, V では有意差を認めた。特に

stage で高い有意差を示し, stage が高い患者については正常加齢による酸化ストレス以外の疾患特異的な酸化ストレスの関与が考えられた. また PD について各 stage ごとに比較すると stage I と II, III, V では有意差を認めなかったが, stage I と stage III では 5% の有意差, stage I と stage V では 5% の有意差, stage II と stage V では 5% の有意差を認めた. しかし stage V まで病期が進行すると尿中 8-OHdG の排泄は低値になる傾向があり, stage III あるいは stage V で最も多量の 8-OHdG を排泄する.

#### D. 考察と結論

MTH1 は dNTP pool に発生する 8-oxo-dGTP を 8-oxo-dGMP まで加水分解する酵素で DNA の複製の際に 8-oxo-dGTP が incorporation されないように防御している. dNTP pool は mtDNA と nuclear DNA に必要であり, それぞれ mitochondria の matrix と cytosolic に存在する. 神経細胞が分裂終了細胞であることを考えると 8-oxo-dGTP 源は主に mitochondria に存在すると考えられる. 従って PD においてのみ MTH1 が上昇していたことは mitochondria 内において酸化ストレスが生じていることを示す. しかも黒質のみで陽性所見が得られたことは酸化ストレスが限局した部位にしようじていることを示すと考える. 一方尿中 8-OHdG の解析については, 測定前日の運動運動負荷による影響を考えなければならないが, 運動量と尿中 8-OHdG の排泄量を検討した報告で

は, 運動負荷量によって有意差があるという報告と有意差はないとする報告があった. 論文で検討されている運動負荷量はかなり大きいものであり, PD 患者の ADL を考えると今回我々が検討した PD 患者の前日の運動量の程度は問診上も 8-OHdG の排泄量に影響を与える要素とは考えにくい. 一方, 加齢による影響を検討した論文は見あたらず, 加齢による 8-OHdG の排泄量の増加は加齢に酸化ストレスが関与している可能性を示唆している. しかしながら, Stage II 以上の PD では, 正常 60 才代と比較しても有意差が存在していたことより加速的の老化反応としての酸化ストレスが全身性に起こっていることを示すと考える. 尿中 8-OHdG は患者に採血とは違い負担が少ない検査であり, しかも stage 進行のマーカーとして有用であることから今後 prospective に進行の結果なのか進行以前に高値を示すのか更に検討を要すると考える.

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shimura Miura H, Hattori N, Kang D, Miyako K, Nakabeppu Y, Mizuno Y: Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in

Parkinson's disease. Ann Neurol, 46: 920-924, 1999

##### 2. 学会発表

Shimura Miura H, Hattori N, Kang D, Miyako K, Nakabeppu Y, Mizuno Y: Increased 8-oxo-dGTPase in the



mitochondria of substantia nigral neurons  
in  
Parkinson's disease. July 28, 1999,  
Vancouver, Canada.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし