

## 2. 学会発表

- 1) Naoi M., Maruyama W., Akao Y. "Models of Parkinson's disease". 9<sup>th</sup> International Catecholamine Symposium, March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan
- 2) Maruyama W., Boulton A. A., Youdim M. B. H., Naoi M. "Anti-apoptotic function of propargylamines". 9<sup>th</sup> International Catecholamine Symposium, March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan
- 3) Maruyama W., Yamada T., Washimi Y., Kachi T., Yanagisawa N., Ando F., Shimokata H., Naoi M. "Neutral (*R*)salsolinol *N*-methyltransferase as a pathogenic factors of Parkinson's disease". 5<sup>th</sup> International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's disease. March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan
- 4) Takahashi T., Maruyama W., Akao Y., Naoi M. "Mechanism of induction of apoptosis by endogenous MPTP-like neurotoxin, *N*-methyl(*R*)salsolinol". 5<sup>th</sup> International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's disease. March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan
- 5) Naoi M., Maruyama W., Boulton A. A., Youdim M. B. H. "Propargylamines as neuroprotective agents in Parkinson's disease". XIV International Congress on Parkinson's Disease. July 27-August 1, 2001, Helsinki, Finland
- 6) Maruyama W., Naoi M., Akao Y. "Mechanism underlying cell death in dopamine neurons by endogenous neurotoxins and oxidative stress: relevance to Parkinson's disease. XIV International Congress on Parkinson's Disease. July 27-August 1, 2001, Helsinki, Finland
- 7) 直井信、伊紅、山岡由理子、丸山和佳子、赤尾幸博、第2回 Japan Parkinson Study Group 研究会 「パーキンソ

- ン病におけるアポトーシス」平成14年2月16日、東京
- 8) 直井信、「パーキンソン病：その病因と神経細胞の保護」第21回運動障害研究会、平成13年1月20日、東京
- 9) 丸山和佳子、直井信「内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinol によるドパミン神経細胞死と propargylamine による細胞死防御の機序に関する研究」第9回 カテコールアミンと神経疾患研究会、平成13年4月21日、東京
- 10) 丸山和佳子、直井信、「経口投与可能な神経保護薬の開発」第42回日本神経学会総会、平成13年5月11-13日、東京
- 11) 丸山和佳子、赤尾幸博、直井信「神経変性疾患におけるミトコンドリア依存性細胞死シグナルとその制御機構」第44回日本神経化学学会大会、平成13年9月26日—28日、京都
- 12) 直井信、丸山和佳子、社本雅代、赤尾幸博「Propargylamine 誘導体による神経細胞保護作用の機構」第74回日本生化学会大会、2001年10月25-28日、京都
- 13) 社本雅代、張進、Harm-Jan W. Borgeld, 倉田美由紀、丸山和佳子、赤尾幸博、直井信、田中雅嗣「ミトコンドリア病に対する遺伝子治療」第74回日本生化学会大会、2001年10月25-28日、京都
- 14) 丸山和佳子、社本雅代、赤尾幸博、田中雅嗣、直井信、「ミトコンドリアによるドパミン神経細胞死の制御機構」第74回日本生化学会大会、2001年10月25-28日、京都
- 15) 丸山和佳子、直井信、赤尾幸博、磯部健一「Propargylamine 化合物、rasagiline による神経保護作用の機序の検討」基礎老化学会
- 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

ドーパミン神経細胞死におけるミトコンドリア遺伝子の関与

分担研究者 田中雅嗣 岐阜県国際バイオ研究所 遺伝子治療研究部長

**研究要旨：**ミトコンドリアは細胞におけるエネルギー産生の主体である同時に、活性酸素種の主要な発生場所となっている。我々は、ミトコンドリア自身の有するゲノムを制御するための基礎研究を行うと同時に、老化における個体差あるいは疾患感受性の相違の基礎をなしているミトコンドリア遺伝子多型の解析を進めた。また、ミトコンドリア機能を補完する抗酸化物質ピルビン酸に注目し、医薬品としての応用の道を探った。

### I. ミトコンドリア病に対する遺伝子治療

#### A. 研究目的

加齢に伴って進行する痴呆や運動障害をもたらす神経疾患の病態に、ミトコンドリア DNA の変異蓄積とそれに伴うミトコンドリア機能低下が関与していると考えられる。変異したミトコンドリア DNA を選択的に除去することができれば、加齢に伴う神経疾患の治療法の開発につながる。

ミトコンドリアゲノムは1細胞あたり数千コピー存在し、ミトコンドリア病患者の組織・細胞においては、変異型 mtDNA と野生型 mtDNA が共存している（ヘテロプラスミー）。変異型 mtDNA の割合が一定の閾値を越えた場合にミトコンドリア機能異常がもたらされる。従って、変異型 mtDNA のみを選択的に破壊・減少させ、野生型 mtDNA を細胞内で優位に立たせれば、完全な遺伝子治療法となる。そこで、変異型 mtDNA のみを選択的に破壊する方法を開発した。

#### B. 研究方法

Mt8993T→G 変異を有する mtDNA のみを切断する制限酵素 *Sma*I をミトコンドリア移行シグナル（pCoxIV）との融合タンパクとして細胞質内で合成させ、ミトコンドリア内へ選択的に運び入れた。

#### C. 研究結果

ミトコンドリアには、組換え修復の機構が存在しないため、二重鎖切断を受けた変異型 mtDNA は DNase によって破壊され、消滅した。これに代わって野生型 mtDNA の増殖が刺激され、ミトコンドリア機能が回復した。こうして、ミトコンドリア DNA に対する遺伝子操作法が確立されると同時に、ミトコンドリア病に対する遺伝子治療法の基礎が築かれた（融合蛋白質発現用組換えベクター、及びその組換えベクターを用いた非ヒト生物の核外遺伝子分解方法、特願 2000-380975）。

実験動物の中では、ハムスターの mtDNA には制限酵素 *Sma*I によって切断される部位が存在するが、ラットあるいはマウスの mtDNA には切断部位はない。このため、ハムスターの心筋や脳組織に pCoxIV-*Sma*I を遺伝子導入した場合には mtDNA が破壊されるが、ラットあるいはマウスでは mtDNA が破壊されない。これによって、遺伝子治療用のベクターの有効性と安全性を確認することができる。

倫理面への配慮について：動物実験に関しては岐阜国際バイオ研究所の実験動物委員会および倫理委員会に諮り、動物愛護の精神に基づき実験を行なった。

## D. 考察

現在、自治医科大学と共同して制限酵素 *Sma*I をミトコンドリアに運び入れるための DNA 断片をアデノ随伴ウイルスベクターに挿入している (rAAV-pCoxIV-SmaI)。アデノ随伴ウイルスは、1) 病原性がないので安全である、2) 心筋細胞や神経細胞などの分裂をしていない細胞にも遺伝子導入が可能である、3) 細胞膜にウイルス蛋白質を提示しないので遺伝子導入された細胞が細胞障害性リンパ球 (CTL) によって攻撃を受けない、4) 長期に安定した遺伝子発現が得られる、などの利点があるので、パーキンソン病の遺伝子治療に向けた動物実験が行われている。

## E. 結論

Mt8993T→G 変異を病因とする疾患に Leigh 脳症がある。この疾患は、乳児期に発症し、ミトコンドリア機能異常に基づく高乳酸血症を伴い、CT では大脳基底核に両側性の萎縮が観察される。呼吸中枢である孤束核が障害されるため、人工呼吸が必要となり、幼児期に死亡する重篤な疾患である。Leigh 脳症は、有効な治療法のない致死性の疾患であるので、遺伝子治療の開発に希望が託されている。培養細胞を用いた実験ならびに、モデル動物となるハムスターを用いた遺伝子治療の基礎実験を実施している。

## II. 長寿につながる遺伝的中庸

### A. 研究目的

ミトコンドリアゲノムによって規定されている蛋白質のアミノ酸配列に関する集団遺伝学的解析から、ある生物の種内において隔離されているアミノ酸置換の大部分は弱有害変異であることが示唆されている。我々は、百寿者においてミトコンドリアの弱有害変異型が少ない、すなわち百寿者は遺伝的に中庸を得ている、との仮説を立てた。

### B. 研究方法

この仮説を検証するために、百寿者 64 名、パーキンソン病患者 96 名、若年成人 96 名についてミトコンドリアのチトクローム *b* 遺伝子の塩基配列を決定し、そのアミノ酸置換を

比較した。

倫理面への配慮について：本研究はミレニアムプロジェクトのための倫理指針を遵守する。他施設において分析を行なう場合には当該施設およびミレニアムプロジェクトのための倫理指針にのっとり研究を行なう。

### C. 研究結果

百寿者群では 9 種の異なったアミノ酸置換が見いだされたのに対し、若年成人群およびパーキンソン病患者群ではそれぞれ 15 種および 21 種のアミノ酸置換が見いだされた。大多数の個体 (百寿者 49 名、若年成人 75 名、パーキンソン病患者 70 名) は、いわゆる「改訂版ケンブリッジ標準配列」と比較して、アミノ酸置換を有していなかった。5 個のアミノ酸置換 (I78T, I164V, N260D, I306V, I369V) は 3 群に共通に見られた。百寿者群では H16R, A39T, A191T および V343M が 1 個体ずつに見いだされた。若年成人群では、百寿者群で検出されなかった 10 種のアミノ酸置換が見いだされた。T2A+I338V, Y109H, D159N, L296M および A380T はそれぞれ 1 個体に、A193T+G251S+L82F は 1 個体に、A193T+G251S+I372V は 2 個体において見いだされた。

標準アミノ酸配列からの逸脱度を定量化するために、我々は、Grantham が報告した値に従って、標準アミノ酸と変化したアミノ酸の間の物理化学的相違の合計を個体ごとに計算した。ただし、3 群において共通に見られたアミノ酸置換はこの計算から除外した。百寿者群における標準アミノ酸配列からの逸脱度 (Grantham 値: 58, 58, 29, 21 が各 1 個体、60 個体については 0) は、若年成人群における逸脱度 (Grantham 値合計: 143, 143, 136, 87, 83, 58, 23, 15 が各 1 個体、他の 88 個体については 0) よりも統計的に有意に小さかった ( $p < 0.0001$ )。

百寿者群においては検出されず、かつ若年成人群とパーキンソン病患者群において共通に観察されたアミノ酸置換は T2A+I338V および A193T+G251S+I372V であった。パーキンソン病患者群においてのみ見いだされたアミノ酸置換は T2I, T47K, T61A, T158A, D171N, A190T, F245L, P247A, I300T,

S344N, および A354T であった。パーキンソン病患者群における標準アミノ酸配列からの逸脱度 (Grantham 値合計: 143 が 5 個体、114, 89, 89, 87, 78 が各 1 個体、58 が 5 個体、46, 29, 27, 27, 23, 22 が各 1 個体、他の 75 個体については 0) は、百寿者群における逸脱度よりも統計的に有意に大きく ( $p=0.0058$ , Mann-Whitney の U 検定)、また若年成人群における逸脱度よりも大きかった ( $p=0.0097$ )。

次に、それぞれの群において 5%以上の頻度で見いだされたアミノ酸置換について統計的に解析した。N260D は百寿者群において 6.25%の頻度 (64 名中 4 名) で見いだされたのに対し、若年成人群とパーキンソン病患者群においてともに 1.04% の頻度で見いだされた (96 名中 1 名)。百寿者群における N260D の頻度 (64 名中 4 名) は他の 2 群における頻度 (192 名中 2 名) より有意に高かった (オッズ比=6.33,  $p=0.036$ , Fisher の直接法)。これらの観察結果は N260D 置換を有することが長寿につながることを示唆しているが、その機能的影響についてはさらに検討を要する。

これに対して、パーキンソン病患者群における G251S 置換の頻度 (96 名中 6 名) は百寿者群における頻度 (64 名中 0 名) より有意に高かった ( $p=0.044$ , Fisher の直接法)。他の疾患対照群における G251S 置換の頻度 (心疾患患者 593 名中 19 名, 3.2%) はパーキンソン病患者群における頻度 (6.9%) と百寿者群における頻度 (0.0%) の中間であった。G251S 置換のような標準アミノ酸配列からの逸脱は、ミトコンドリアからの活性酸素種の産生上昇を伴い、それが加齢に関連する疾患をもたらす可能性がある。アミノ酸残基 Gly251 は哺乳類の種において高度に保存されている。Gly251 はチトクローム *b* 蛋白質におけるユビキノンの外側結合部位 (Qo site) に位置しており、ユビキノンとの結合に重要な働きをしている Glu271 残基の近傍にある。Ser が Gly251 を置換すると、この Ser は Glu271 と水素結合を形成する可能性がある。これによって Glu271 の動きが制限されると、ユビキノンの Qo site への結合が変化すると想定される。これらの知見は G251S 置換は長期生存に不利であることを

示唆している。

#### D. 考察

我々は遺伝子型 Mt5178A が日本の百寿者において高い頻度で見いだされることを既に報告した。一方、Ivanova らは遺伝子型 Mt9055A がフランスの百寿者に高い頻度で見いだされたと報告している。標準アミノ酸配列からの逸脱が少ないことは、遺伝子型を異にするアジアとヨーロッパの百寿者に共通する現象である可能性がある。結論として、少なくともチトクローム *b* のアミノ酸配列に関して中庸を得ることは、長寿に関して重要な遺伝的要因であるといえよう。

#### E. 結論

多様なアミノ酸置換が若年成人群において見いだされたことは、これらの置換が成熟期までの個体の生存、およびそのゲノムの次世代への伝達にほとんど影響を及ぼさないことを意味している。特定のアミノ酸置換が百寿者において存在せず、パーキンソン病患者において存在することは、これらのアミノ酸置換が長期生存に対して不利であり、むしろ成人発症性疾患に罹り易くさせることを示している。多様な弱有害ミトコンドリア変異型を検出する多重分析系を、長寿に関連する遺伝子型についての遺伝学的検査と組み合わせれば、これらは長寿の予測および加齢に関連した疾患のリスクの評価に有用であろう。

### III. ピルビン酸の医療への利用

#### A. 研究目的

ミトコンドリアを持たない細胞も生体内には多い。赤血球は、細胞質にヘモグロビンを詰め込み、ミトコンドリアを欠如している。ミトコンドリアがもし赤血球にあれば、ミトコンドリアから漏出する活性酸素種によって、ヘモグロビンが酸化されメトヘモグロビンとなり、酸素輸送が不可能になってしまうだろう。水晶体や、腎臓における尿の濃縮に関与する髓質の細胞の大部分もミトコンドリアを欠いている。これらのミトコンドリアのない細胞では、解糖系がエネルギー供給を担う。解糖系では、1 分子のグルコースが 2 分子の乳酸に分解される時に 2 分子の ATP が産生

される。解糖系の前半では、還元が行われ NADH が生じる。この NADH はピルビン酸に渡され、乳酸を生じ、NAD<sup>+</sup>が再生される。結局、解糖系における NADH の収支はゼロである。しかし、細胞内ではグルコース以外の物質の異化も行われており、これらの反応によって生じた NADH が細胞質に蓄積し、過還元ストレスの状態に陥る。

糖尿病におけるポリオール代謝異常にも NADH の蓄積が関与している。高血糖によってグルコースが細胞に入ると、アルドース還元酵素が NADPH 依存性にグルコースをソルビトールに還元する。ソルビトールは細胞から排出されにくいため蓄積し、浸透圧を上昇させるなどの悪影響を与える。遅い反応ではあるが、ソルビトールはソルビトール脱水素酵素によって NAD<sup>+</sup>依存性に酸化され、フルクトースになる。その結果、水晶体などのミトコンドリアを有しない細胞では、NAD<sup>+</sup>が不足し、NADH が過剰になる。この過還元ストレスによって、ジアシルグリセロールが上昇し、プロテインキナーゼ C が活性化され、一連の細胞内情報伝達系が攪乱されると仮定されている。細胞毒性の高いソルビトールやフルクトースの蓄積を防止するために、アルドース還元酵素阻害剤が臨床的に使用されているが、ソルビトールが速やかにフルクトースとなるように、NAD<sup>+</sup>の不足と NADH の過剰を補正する薬剤が開発されれば、白内障や末梢神経障害などの糖尿病の合併症を予防することが可能になると期待される。

## B. 研究方法

飲酒は NADH の過剰と NAD<sup>+</sup>の不足をもたらす、細胞に過還元ストレスを与える。エタノールはアルコール脱水素酵素によりアセトアルデヒドになる。アセトアルデヒドはアルデヒド脱水素酵素により酢酸となる。生じた 2 分子の NADH を酸化するのはミトコンドリアであり、この過程がエタノール代謝の律速段階である。ミトコンドリアでの NADH の酸化が NADH の供給に追いつかなくなると、NADH が蓄積し、NAD<sup>+</sup>が不足する。その結果、エタノールやアセトアルデヒドの代謝速度が低下し、アセトアルデヒドが蛋白質を攻撃し、シッフ塩基を形成したり、様々な

副反応が起き、細胞障害につながる。悪心、嘔吐などの不快な症状を伴い、二日酔いの状態に陥る。

[NADH]/[NAD<sup>+</sup>]比の上昇は、糖代謝、脂質代謝に大きな影響を与える。過剰な NADH はピルビン酸に渡され、乳酸を生じ、乳酸アシドーシスを惹起する。

一方、ピルビン酸は糖新生の出発材料である。肝臓では、ミトコンドリア内のピルビン酸がピルビン酸カルボキシラーゼによってオキサロ酢酸になり、NADH によって還元されリンゴ酸となり、ミトコンドリアの外に運び出され、細胞質でオキサロ酢酸に戻される。オキサロ酢酸はホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼによってホスホエノールピルビン酸となり、解糖系を逆行して、グルコースが作られる。ミトコンドリアからオキサロ酢酸がリンゴ酸として出ていくことが、糖新生の第 1 段階として必要なものである。ピルビン酸が NADH の過剰によって乳酸に転換されてしまうと、ピルビン酸が不足し、肝臓における糖新生が阻害され、低血糖に陥る。

## C. 研究結果

我々は、ピルビン酸を経口摂取すると、速やかに吸収され、肝臓内の NADH の過剰状態を補正し、エタノール代謝を促進することを示している (特許登録 313029)。またピルビン酸は過酸化水素と非酵素的に反応し酢酸と水を生じるので、重要な抗酸化物質であることが知られている。過酸化水素によって誘導される細胞のアポトーシスをピルビン酸が抑制することも明らかになった。倫理面への配慮について：本年度の研究は基礎研究であるため、特に問題はない。

## D. 考察

しかし、ピルビン酸は体外受精時の卵子の保護液として用いられている以外は、医療に応用されていない。一つの問題点は、ピルビン酸の水溶液状態での不安定性であるが、ピルビン酸塩の粉末を供給し、滅菌水に溶解し直ちに使用することで不安定性を克服できる。ピルビン酸ナトリウムとして投与すると乳酸アシドーシスの補正が可能であるが、ナトリウムが過剰になり、浮腫あるいは血圧上昇な

どの問題が生じる。

## E. 結論

我々は、ピルビン酸をミトコンドリア病患者および糖尿病性腎不全患者に対する腹膜透析に用い、ピルビン酸が代謝され、乳酸となった段階で回収することにより、ナトリウム過剰の問題を回避することができると考えている。また、ピルビン酸はグルタミン酸からアミノ基の転移を受けアラニンとなるので、アミノ基を尿素として排泄できない慢性肝不全患者におけるアミノ酸代謝異常を改善する効果を有する。実験動物におけるピルビン酸の有効性を実証する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Fuku N, Oshida Y, Takeyasu T, Guo L-J, Kurata M, Yamada Y, Sato Y, Tanaka M. Mitochondrial ATPase subunit 6 and cytochrome b gene polymorphisms in young obese adults. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1199-1205, 2002

Matsunaga H, Tanaka Y, Tanaka M, Gong JS, Zhang J, Nomiyama T, Ogawa O, Ogihara T, Yamada Y, Yagi K, Kawamori R. Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 24: 500-503, 2001

Mizutani J, Chiba T, Tanaka M, Higuchi K, Mori M. Unique mutations in mitochondrial DNA of senescence-accelerated mouse (SAM) strains. *J Hered* 92: 352-355, 2001

Sahashi K, Yoneda M, Ohno K, Tanaka M, Ibi T. Functional characterisation of mitochondrial tRNA(Tyr) mutation (5877->GA) associated with familial chronic progressive external ophthalmoplegia. *J Med Genet* 38: 703-705, 2001

Terasaki F, Tanaka M, Kawamura K, Kanzaki Y, Okabe M, Hayashi T, Shimomura H, Ito T, Suwa M, Gong JS, Zhang J, Kitaura Y. A case of cardiomyopathy showing progression from the hypertrophic to the dilated form: association of Mt8348A->G mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene with severe ultrastructural alterations of mitochondria in cardiomyocytes. *Jpn Circ J* 65: 691-694, 2001

Umetsu K, Tanaka M, Yuasa I, Saitou N, Takeyasu T, Fuku N, Naito E, Ago K, Nakayashiki N, Miyoshi A, Kashimura S, Watanabe G, Osawa M. Multiplex amplified product-length polymorphism analysis for rapid detection of human mitochondrial DNA variations. *Electrophoresis* 22: 3533-3538, 2001

Yamada Y, Ichihara S, Izawa H, Tanaka M, Yokota M. Association of a G994->T (Val279->Phe) polymorphism of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene with myocardial damage in Japanese patients with nonfamilial hypertrophic cardiomyopathy. *J Hum Genet* 46: 436-441, 2001

Yamada Y, Miyauchi A, Takagi Y, Tanaka M, Mizuno M, Harada A. Association of the C-509->T polymorphism, alone or in combination with the T869->C polymorphism, of the transforming growth factor-beta1 gene with bone mineral density and genetic susceptibility to osteoporosis in Japanese women. *J Mol Med* 79: 149-156, 2001

### 2. 学会発表

Tanaka M. Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis. In *Biotechnology, the Genome and Human Ageing*. Australian Society for Cellular and Molecular Gerontology. Melbourne, March 19, 2001

Tanaka M, Borgeld H-J W, Zhang J, Shamoto M, Fuku N, Kurata M, Yamada Y, Nishizawa K, Akao Y. Gene therapy for mitochondrial cardiomyopathy. In *10th International Congress on Cardiovascular Pharmacotherapy and WHF/ISCP Joint International Symposium on Cardiomyopathy in the 21st Century*, Kyoto, March 29, 2001

Tanaka M, Takeyasu T, Kurata M, Yamada Y, Fuku N, Shamoto M. Possible contribution of mitochondrial polymorphisms to neurodegenerative diseases. The 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease. Kyoto, April 1, 2001

Tanaka M. Single nucleotide polymorphisms of mitochondrial DNA associated with longevity. *International Workshop on Mitochondria*, Taipei, August 14, 2001

Tanaka M. Gene therapy for mitochondrial disease. International Workshop on Mitochondria, Kaushung, August 17, 2001

田中雅嗣：ミトコンドリア遺伝子変異の蓄積と老化 平成 13 年度日本変異原学会公開シンポジウム、東京、平成 13 年 5 月 26 日

田中雅嗣：ピルビン酸のエタノール代謝促進とミトコンドリア機能補完効果 第 36 回日本アルコール・薬物医学会 教育講演、東京、平成 13 年 10 月 11 日

福典之、押田芳治、武安岳史、郭麗君、佐藤祐造、田中雅嗣：肥満者におけるミトコンドリア ATP6/8 遺伝子の SNPs の解析 第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会、一般演題、京都、平成 13 年 4 月 16 日

福典之、佐藤祐造、押田芳治、武安岳史、郭麗君、倉田美由紀、田中雅嗣：青年肥満者におけるミトコンドリア cytochrome b 遺伝子の解析 第 74 回日本生化学会大会、一般演題、京都、平成 13 年 10 月 25 日

福典之、押田芳治、武安岳史、郭麗君、倉田美由紀、佐藤祐造、田中雅嗣：ミトコンドリアの ATP6 およびシトクローム b 遺伝子多型の特徴 第 1 回日本ミトコンドリア研究会、一般演題、川崎、平成 14 年 1 月 31 日

押田芳治、福典之、大沢功、石黒洋、小川豊昭、近藤孝晴、高橋俊彦、佐藤祐造、田中雅嗣：肥満学生におけるミトコンドリア遺伝子(mtDNA)の単塩基置換 (SNPs) 第 39 回全国大学保健管理研究集会、一般演題、愛媛、平成 13 年 9 月

武安岳史、福典之、押田芳治、佐藤祐造、梅津和夫、宮田浩文、田中雅嗣：持久性運動成績とミトコンドリア ATP8/6 遺伝子の SNPs 第 5 回日本体力医学会東海地方会学術集会、2001 年 3 月 17 日、名古屋

武安岳史、福典之、押田芳治、佐藤祐造、梅津和夫、宮田浩文、田中雅嗣：持久性運動成績とミトコンドリア ATP8/6 および

Cytochrome b 遺伝子の SNPs 第 56 回日本体力医学会大会、2001 年 9 月 21 日、仙台

田中雅嗣：加齢、ミトコンドリア、パーキンソン病—長寿への中庸性— 第 10 回パーキンソン病治療研究会、東京、平成 13 年 10 月 27 日

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

田中雅嗣：ヒトミトコンドリア DNA を用いた遺伝子検出方法 (登録 3251219)

田中雅嗣：ミトコンドリア DNA を用いた遺伝子検出方法 (特願 2001-318805)

### 2. その他

#### テレビ・ラジオ放送

体内アルコール分解の薬 NHK 総合テレビ「おはよう日本」平成 13 年 2 月 26 日

さよなら 二日酔い!? 名古屋テレビ「TRY アングル」平成 13 年 3 月 6 日

アルコール代謝促進剤の開発と特許申請 岐阜放送「気分はごきげん」ラジオでおじゃまします 平成 13 年 3 月 22 日

お酒と健康 送別会シーズン近づく 中部日本放送「ユーガッタ! CBC」平成 13 年 3 月 26 日

きんさん・ぎんさん 長寿の秘密 NHK 総合テレビ「クローズアップ現代」平成 13 年 4 月 2 日

発明の日 アルコール代謝促進剤 ZIP FM「ZIP モーニング・プレス」平成 13 年 4 月 18 日

#### 新聞発表

岐阜県研究所開発 二日酔い防止に「新薬」朝日新聞 平成 13 年 3 月 6 日

岐阜国際バイオ研究所 ミトコンドリア病の遺伝子治療モデル実験に成功 日経バイオテ



ク 平成 13 年 11 月 5 日 p.25

日本の研究 高レベル 変異から長寿の秘訣  
遺伝子に聞け 配列の個人差比較 日本経  
済新聞 2001 年 12 月 17 日

岐阜県国際バイオ研究所 変異から長寿など  
診断 ミトコンドリア遺伝子で 日経産業新  
聞 2001 年 12 月 27 日

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

家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物パーキンの機能解析  
-パーキンの基質同定を中心にして-

分担研究者 服部信孝 順天堂大学医学部神経学教室  
老人性疾患病態治療研究センター講師

研究要旨：孤発性パーキンソン病の原因は不明である。しかし近年見いだされた遺伝性パーキンソン病における細胞死のメカニズムを研究することが、病因解明の端緒となる可能性がある。遺伝性パーキンソン病においてはユビキチン・プロテアソーム系の異常が共通に引き起こされており、これがドパミン神経に選択的細胞死の原因に関与していると考えられる。Park2 である parkin 遺伝子はユビキチンリガーゼであることを見出した。parkin の基質である CDCrel-1 を同定し、その機能、特に神経伝達物質の放出に及ぼす影響を検討した。

A. 研究目的

家族性アルツハイマー病（AD）の病態研究より孤発型 AD の研究の戦略に大きなヒントを与えたように単一遺伝子異常で起こる家族性パーキンソン病（PD）の解明が孤発型 PD の解明に大きなヒントを与えてくれることが期待される。家族性 AD の原因遺伝子産物であるアミロイドβ蛋白前駆体（APP）、プレセニン1、プレセニン2 の遺伝子変異は何れもアミロイドβ蛋白 42（Aβ42）の産生増加を起す。つまり家族性 AD は同じカ

スケードに異常を来している。更に孤発型 AD においても Aβ42の蓄積という共通した現象を共有している。このことは PD についても言えるであろう。事実、Park1-10 までがシンボルとして登録されているが、原因遺伝子が単離されている Park2 (parkin), Park5 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, UCH-L1) については何れもユビキチン・プロテアソーム系に関与している分子であり、Park1 についてもユ

ビキチン陽性封入体である Lewy 小体の主要成分であることが証明されており PD に共通した反応系としてユビキチン・プロテアソーム系が重要な鍵を握っていることは間違いないと考えている。我々が単離同定に成功した若年性パーキンソン病 (AR-JP) の原因遺伝子 parkin はユビキチン・プロテアソーム系において分解されるべき基質選別に重要な役割をなしている ubiquitin ligase であることが分かっている。しかしながら、その詳細な機能解析は今始まったばかりであり、AR-JP の黒質神経細胞死のメカニズムについては何も分かっていない。そこで我々は parkin と結合しうる分子について詳細な検討を加えることで細胞死のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## B: 研究方法

parkin と結合する分子の同定: yeast two hybrid system で結合分子をスクリーニングした。parkin 遺伝子の ubiquitin like domain から linker 部 (ubl-linker) を GAL4 DNA binding domain を含む yeast two hybrid vector (pGBD-C1) に cloning し、brain cDNA library および SH-SY5Y からの cDNA library を GAL4 活性ドメインと結合させ行った。Parkin ubl-linker を transfection

した yeast (PJ69-4A (MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ)) に Brain cDNA library, SH-SY5Y cDNA library をそれぞれ transfection した。その yeast を SD/-Trp/-Leu/-His plate で選択し、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade plate で確認した。結合を確認するために pGAD-C1 cDNA clone を yeast より回収し pGBD-C1 parkin、pGBD-C1 ubl-linker とともにそれぞれ co-transformation を行い  $\beta$ -galactosidase assay にて結合分子を選択した。

発現プラスミドおよび培養細胞への transfection: まず、pcDNA3.1(+) (Invitrogen) の KpnI/BamHI site に Myc- と Flag- の tag 蛋白を code する oligo DNA を結合させ、このプラスミドに PCR により増幅した parkin 全長、parkin の ubl domain, ubl-linker, delta-ubl, RING box、および CDCrel-1 を cloning した。SH-SY5Y、PC12、NT2、HeLA および HEK293 を 10% fetal bovine serum を加えた DMEM で培養した。プロテアソーム阻害は MG132 (50  $\mu$ M; Peptide Institute) を加えて 6 時間反応させた。

変異 parkin は pcDNA3.1 Flag-

parkin に対して, site directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いて, それぞれの point mutation を挿入し作成した.

免疫沈降法: Transfection 後 36 時間培養し, lysis buffer で細胞を破壊し, 15000g, 15 分遠心した上清を用いた. 免疫沈降法の抗体はそれぞれ rabbit polyclonal anti-Myc antibody (A-14; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-Myc antibody (9E10; Santa Cruz Biotechnology) を使用し, Western blot の抗体は monoclonal anti-Myc antibody, mouse monoclonal anti-FLAG(M2) antibody (Sigma), mouse monoclonal anti-HA antibody (HA.11; Berkeley Antibody company) を使用した.

Exocytosis の検討: parkin が synaptic vesicle 上に存在することより exocytosis に関与していることを推定し, ヒト成長ホルモン (GH) を tracer に HIT-T15 に double transfection し分泌される GH を ELISA にて測定し, exocytosis の関与を検討した.

倫理面への配慮は細胞実験であるため特に必要ではないと考えられた.

### C. 研究結果

yeast two hybrid system で 15

clone を単離できた. その一つに CDCrel-1 が含まれていた. CDCrel-1 と parkin の結合は mammalian cell 内での結合も確認できた. CDCrel-1 と parkin の ubiquitin-proteasome 系への関与について In vivo 系検討を行ったが polyubiquitination された high molecular mass は認めず CDCrel-1 は主要な基質とは考えにくいと考えた. Exocytosis の関与については CDCrel-1 の overexpression が exocytosis を抑制するとする報告はあるが我々の系では再現出来なかった. SNARE complex を形成している SNAP25 の C 末が欠損している mutant では exocytosis が抑制されており実験系には問題ないと考えている. 更に parkin の様々な mutant を作製し, exocytosis の関与について検討したところ T415N 変異 parkin が exocytosis を dose dependent に抑制した. Parkin が exocytosis に関与している可能性が考えられた.

### D. 考察

Yeast two hybrid screening で CDCrel-1 が単離されたが, polyubiquitination された high molecular mass は認めず主要な parkin の基質とはなりえないと考えている. しかしながら, CDCrel-1

は synaptic vesicle 上に存在し、我々は再現出来なかったが、overexpression させると exocytosis を抑制させるという報告もあり、parkin の exocytosis の関与は十分考えられる。今回の結果は変異 parkin が exocytosis を抑制したことより dominant negative effect 的に影響を与えていると考えている。今後の課題としては parkin animal model の作製と exocytosis への関与の検討と antisense parkin などを用いて内在性 parkin を減少させた場合の機能変化を検討する必要があると考えている。変異 parkin の exocytosis の関与はドパミンの遊離が十分されず細胞内で溜まることで酸化ストレス介した細胞死を起こしていると考えている。

#### E. 結論

parkin の基質である CDCrel-1 の蓄積は、ドパミン放出を阻害することにより酸化的ストレス増大と細胞死を惹起する可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takanashi M, Mochizuki H, Yokomizo K, Hattori N, Mori H,

Yamamura Y, Mizuno Y. Iron accumulation in the substantia nigra of autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP). *Parkinsonism Relat. Disord* 7:311-314, 2001.

2) Mellick GD, Buchanan DD, Hattori N, Brookes AJ, Mizuno Y, Le Couteur DG, Silburn PA.: The parkin gene S/N167 polymorphism in Australian Parkinson's disease patients and controls. *Parkinsonism Relat. Disord.* 7:89-91, 2001

3) Lu CS, Wu JC, Tsai CH, Chen RS, Chou YH, Hattori N, Yoshino H, Mizuno Y.: Clinical and genetic studies on familial parkinsonism: the first report on a parkin gene mutation in a Taiwanese family. *Mov Disord* 16:164-166, 2001.

4) Kubo S, Kitami T, Noda S, Shimura H, Uchiyama Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y, Hattori N.: Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem* 78: 42-54, 2001

5) Wang M, Suzuki T, Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N.: Expression of parkin and a parkin-interacting protein, ubiquitin-conjugating enzyme, UbcH7 in the developing rat brain. *J Neurochem* 77:1561-1568, 2001.

6) Nisipeanu P, Inzelberg R, Abo Mouch S, Carasso RL, Blumen SC, Zhang J, Matsumine H, Hattori N, Mizuno Y.:

- Parkin gene causing benign autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Neurology* 56: 1573-1577, 2001.
- 7) Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ.: Ubiquitination of a novel form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson disease. *Science* 293:263-269, 2001.
- 8) Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R.: An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of parkin. *Cell* 105: 891-902, 2001.
- 9) Shimo-Nakanishi Y, Urabe T, Hattori N, Watanabe Y, Nagao T, Yokochi M, Hmamoto M, Mizuno Y.: Polymorphism of the lipoprotein lipase gene and risk of atherothrombotic cerebral infarction in the Japanese. *Stroke* 32:1481-1486, 2001.
- 10) Jeon BS, Kim JM, Lee DS, Hattori N, Mizuno Y. An apparently sporadic case with parkin gene mutation in a Korean woman. *Arch Neurol* 58:988-989, 2001.
- 11) Tanaka K, Suzuki T, Chiba T, Shimura H, Hattori N, Mizuno Y: Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *J Mol Med.* 79:482-94, 2001
- 12) 服部信孝, 志村秀樹: ユビキチンリガーゼとしての Parkin と Parkinson 病—家族性 Parkinson 病から孤発型 Parkinson 病へ—. *実験医学* 19:162-167, 2001.
- 13) 服部信孝, 久保紳一郎, 北見聡章, 王 梅, 佐藤健一, 水野美邦. parkin 遺伝子とその異常. *Clinical Neuroscience 別刷* 19: 656-659, 2001
- 14) 服部信孝, 水野美邦. パーキンソン病の病態解明に向けて今ここまで原因がわかった. *Molecular Medicine* 38: 1236-1246, 2001
- 服部信孝, 鈴木俊顕, 高橋良輔. ユビキチンリガーゼとしての parkin と Parkinson 病—家族性 Parkinson 病から孤発型 Parkinson 病へ—. *医学のあゆみ* 198: 383-388, 2001
- 15) 服部信孝. 若年性パーキンソン病原因遺伝子産物パーキン蛋白の細胞内局在. *生体の科学* 52: 613, 2001
- 16) 服部信孝, 水野美邦. ミトコンドリア機能異常と神経変性疾患—パーキンソン病におけるミトコンドリア機能異常を中心に—*内分泌・糖尿病科* 13: 478-485, 2001
- 17) 久保紳一郎, 服部信孝, 水野美邦. パーキンソン病の研究の方向と進歩. *老年医学* 14: 55-61, 2001
- 18) 今居譲, 服部信孝, 高橋良輔. パーキンソン病: 異常タンパク質蓄積による神経細胞死病. *実験医学* 19: 2277-2282, 2001

- 19) 服部信孝. パーキンソン病の原因を追って. 順天堂医学 47: 203-208, 2001
- 20) 服部信孝, 水野美邦. パーキンソン病の分子遺伝学. 順天堂医学 47: 53-70, 2001
- 21) 久保紳一郎, 服部信孝, 水野美邦. Parkinson 病最前線. 最新医学 56:1588-1594, 2001

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
M. Naoi, W. Maruyama	An endogenous dopamine-derived neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol: Induction of apoptosis in dopamine neurons	J. Segura-Aguilar	Mechanism of Degeneration and Protection of Dopamine System	FP Graham Publishing Co	Johnson	2001	105-129
丸山和佳子、直井信	新しい神経保護療法の可能性		最新医学	最新医学社	東京	2002	308-313
丸山和佳子、直井信	酸化ストレスから見たドパミン神経細胞死の機序		先端医療シリーズ14	先端医療社	東京	2001	118-122
直井信、丸山和佳子	パーキンソン病：その病因と神経細胞の保護		運動障害	運動障害	東京	2001	11
丸山和佳子、直井信	パーキンソン病の病因：最近の研究から		老年精神医学雑誌	老年精神医学	東京	2001	343-348
丸山和佳子	孤発性パーキンソン病の病因の探索		日本老年医学会雑誌	日本老年医学会	東京	2001	494-497
田中雅嗣	ミトコンドリア遺伝子変異の蓄積と老化		Environ. Mutagen Res.	日本環境変異原学会	東京	2001	197-205
服部信孝、志村秀樹	ユビキチンリガーゼとしての Parkin と Parkinson 病—家族性 Parkinson 病から孤発性 Parkinson 病へ—		実験医学	羊土社	東京	2001	162-167
服部信孝、久保紳一郎、北見聡章、王	parkin 遺伝子とその異常.		Clinical Neuroscience 別刷 19	中外医学社	東京	2001	656-659



梅，佐藤 健一，水 野美邦.							
服部信 孝，水野 美邦	パーキンソン病 の病態解明に向 けて今ここまで 原因がわかった		Molecular Medicine	中山書 店	東京	2001	1236 - 1246
服部信 孝，鈴木 俊顕，高 橋良輔	ユビキチンリガ ーゼとしての parkin と Parkinson 病 - 家族性 Parkinson 病か ら孤発型 Parkinson 病へ		医学のあゆみ	医学の あゆみ 社	東京	2001	383- 388
服部信孝	若年性パーキン ソン病原因遺伝 子産物パーキン 蛋白の細胞内局 在		生体の科学	生体の 科学社	東京	2001	613
服部信 孝，水野 美邦	ミトコンドリア 機能異常と神経 変性疾患-パー キンソン病にお けるミトコンド リア機能異常を 中心に-		内分泌・糖尿 病科	科学評 論社	東京	2001	478- 485
久保紳一 郎，服部 信孝，水 野美邦	パーキンソン病 の研究の方向と 進歩		老年医学	老年医 学社	東京	2001	55- 61
今居謙， 服部信 孝，高橋 良輔.	パーキンソン 病：異常タンパ ク質蓄積による 神経細胞死病		実験医学	実験医 学社	東京	2001	2277 - 2282
服部信孝	パーキンソン病 の原因を追って		順天堂医学		東京	2001	203- 208
服部信 孝，水野 美邦	パーキンソン病 の分子遺伝学		順天堂医学		東京	2001	53- 70

久保紳一 郎，服部 信孝，水 野美邦	Parkinson 病最 前線		最新医学	最新医 学社	東京	2001	1588 - 1594
-----------------------------	--------------------	--	------	-----------	----	------	-------------------

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
T. Yamamoto, W. Maruyama, Y. Kato, H. Yi, M. Shamoto-Nagai, M. Tanaka, Y. Sato, M. Naoi	Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: Involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells.	J. Neural Transm.	109	1-13	2002
T. Uezono, K. Matsubara, W. Maruyama, M. Naoi, K. Shimizu, O. Saito, K. Ogawa, H. Mizukami, N. Hayase, H. Shiono	Norharman, an indoleamine-derived beta-carboline, but not Trp-p-2, a gamma-carboline, induces apoptotic cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.	J. Neural Transm.	108	943-953	2001
B. E. Toth, K. Homicsko, B. Radnai, W. Maruyama, J. E. DeMaria, M. Vecsernyes, M. I. K. Fekete, F. Fülöp, M. Naoi, M. E. Freeman, M. Nagy	Salsolinol is a putative endogenous neuro-intermediate lobe prolactin releasing factor.	J. Neuroendocrinol.	13	1-14	2001
M. Naoi, W. Maruyama	Future neuroprotection in Parkinson's disease.	Parkinsonism and Related Disorders.	8	139-145	2001
W. Maruyama, Y. Akao, M. B. H. Youdim, B. A. Davis, M. Naoi	Transfection-enforced Bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxin, <i>N</i> -methyl( <i>R</i> )salsolinol.	J. Neurochem.	78	727-735	2001
W. Maruyama, M.B.H. Youdim, M. Naoi	Antiapoptotic properties of rasagiline, <i>N</i> -propargylamine-1( <i>R</i> )-aminoindan, and its optical ( <i>S</i> )-isomer, TV1022.	Ann. New York Acad. Sci.	939	320-329	2001
W. Maruyama, Y. Kato, T. Yamamoto, K. Oh-hashii, Y. Hashizume, M. Naoi	Peroxyntirite induces neuronal cell death in aging and age-associated disorders.	J. Amer. Aging Assoc.	24	11-18	2001
K. Oh-hashii, W. Maruyama, K. Isob	Peroxyntirite induces gadd34, 45 and 153 via p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.	Free Rad. Biol. Med.	30	213-221	2001

W. Maruyama, A. A. Boulton, B. A. Davis, P. Dostert and Makoto Naoi	Enantio-specific induction of apoptosis by an endogenous neurotoxin, <i>N</i> -methyl( <i>R</i> )salsolinol, in dopaminergic SH-SY5Y cells: Suppression of apoptosis by <i>N</i> -(2-heptyl)- <i>N</i> -methylpropargylamine	J. Neural Transm.	108	11-24	2001
丸山和佳子、直井信	パーキンソン病におけるドーパミン神経細胞死の機序に関する研究	Progress in Medicine	22	197-201	2002
丸山和佳子、直井信	内在性神経毒、 <i>N</i> -methyl( <i>R</i> )salsolinol によるドーパミン神経細胞死と propargylamine による細胞死防御の機序に関する研究	Progress in Medicine	21	1937-1942	2001
Fuku N, Oshida Y, Takeyasu T, Guo L-J, Kurata M, Yamada Y, Sato Y, Tanaka M.	Mitochondrial ATPase subunit 6 and cytochrome b gene polymorphisms in young obese adults.	Biochem Biophys Res Commun	290	1199-1205	2002
Mizutani J, Chiba T, Tanaka M, Higuchi K, Mori M.	Unique mutations in mitochondrial DNA of senescence-accelerated mouse (SAM) strains.	J Hered	92	352-355	2001
Sahashi K, Yoneda M, Ohno K, Tanaka M, Ibi T.	Functional characterisation of mitochondrial tRNA(Tyr) mutation (5877->GA) associated with familial chronic progressive external ophthalmoplegia.	J Med Genet	38	703-705	2001
Terasaki F, Tanaka M, Kawamura K, Kanzaki Y, Okabe M, Hayashi T, Shimomura H, Ito T, Suwa M, Gong JS, Zhang J, Kitaura Y.	A case of cardiomyopathy showing progression from the hypertrophic to the dilated form: association of Mt8348A->G mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene with severe ultrastructural alterations of mitochondria in cardiomyocytes.	Jpn Circ J	65	691-694	2001
Umetsu K, Tanaka M, Yuasa I, Saitou N, Takeyasu T, Fuku N, Naito E, Ago K, Nakayashiki N, Miyoshi A, Kashimura S, Watanabe G, Osawa M.	Multiplex amplified product-length polymorphism analysis for rapid detection of human mitochondrial DNA variations.	Electrophoresis	22	3533-3538	2001