

老化に伴うトパミン神経の選択的細胞死の機序

生体の科学 53(5) 421-424 2002 令原一郎記念医学医療振興財団

丸山和佳子、直井信

パーキンソン病の原因とは何か

ケアスタッフ 89-95, 2002 医歯泉出版社

2 学会発表

W Maruyama Y Akao H Yi Y Tsujimoto M Naoi

Role of mitochondria in cell death of Parkinson s disease

32th Meeting of Society for Neuroscience

November 4 2002 Orland USA (poster)

Neuroscience program Monday 84

M Naoi W Maruyama Y Akao H Yi M B H Youdim

Neuroprotection by rasagiline and related compounds

32th Meeting of Society for Neuroscience

November 4 2002 Orland USA (oral)

Neuroscience program Monday 54

W Maruyama M B H Youdim M Naoi

Molecular mechanism underlying neuroprotective function of type B monoamine oxidase inhibitor analogues

10th International Amine Oxidase Workshop

August 28 2002 Istanbul Turkey (poster)

Book of Abstract 58

W Maruyama M Naoi

Modified protein by oxidative stress in Parkinson s disease

Interdisciplinary approaches for the understanding of neuropsychiatric disorders

April 28 2002 Passau Germany (oral)

Book of Abstract 50

W Maruyama

Cell death in Parkinson s disease

10th International Symposium of Therapy for Parkinson s Disease

October 27 2001 Tokyo Japan (symposium)

丸山和佳子、永井雅代、西谷弘美、小塚真弓、加藤陽二、磯部健一、大澤俊彦、直井信 パーキンソン病の神経変性におけるミトコントリアの役割

第 75 回日本生化学会 2002 10/16 京都

生化学 74 937 2002

永井雅代、西谷弘美、小塚真弓、磯部健一、大澤俊彦、田中雅嗣、直井信、丸山和佳子 ミトコントリア不全によるパーキンソン病の細胞死モデル

第 75 回日本生化学会 2002 10/16 京都

生化学 74 811, 2002

丸山和佳子 永井雅代、田中雅嗣、直井信 Role of oxidized protein in neuronal cell death of Parkinson s disease

第 45 回日本神経化学会 札幌 7/17、18
神経化学 41 354

直井信、丸山和佳子、赤尾幸博、辻本賀
英 Mechanism of neuroprotection by
propargylamine

第 45 回日本神経化学会 札幌 7/17、18
神経化学 41 354

丸山和佳子、直井信 パーキンソン病の
神経細胞死におけるミトコントリアの役
割

第 43 回日本神経学会 2002 5/29 札
幌

日本神経学総会 プロケラム 抄録集
68

直井信、丸山和佳子 神経変性疾患に対
する新たな神経保護薬の開発

第 43 回日本神経学会 2002 5/30 札
幌

日本神経学総会 プロケラム 抄録集
207

丸山和佳子 神経細胞の老化と個体老化
第 25 回日本基礎老化学会 東西競演若
手企画シンポジウム 2002 5/18 筑波
基礎老化研究 26 36

H 知的財産権の出願・登録状況（予定
を含む。）

なし

共同研究報告書

パーキンソン病患者 96 名および百寿者 96 名のヒトミトコントリアゲノム全塩基配列の決定とそれに基づく一塩基多型の頻度比較

共同研究者 田中 雅嗣

財団法人岐阜国際ハイオ研究所遺伝子治療研究部長

共同研究者 武安岳史、福 典之、廣瀬雷太、倉田美由紀 山田芳司（財団法人岐阜国際ハイオ研究所）、押田芳治 佐藤祐造（名古屋大学総合保健体育センター）、服部信孝 水野美邦（順天堂大学神経内科）、新井康通、広瀬信義（慶応大学老年内科）

分担研究者 丸山和仕子（国立療養所中部病院長寿医療研究センター）

研究要旨 加齢に伴って発症する神経変性疾患の代表としてパーキンソン病を選び 96 例の患者についてミトコントリアゲノムの全塩基配列を決定した。一方、百寿者 96 名のミトコントリアゲノムの全塩基配列を決定し パーキンソン病患者群で見いだされたミトコントリアゲノム一塩基多型 (mtSNP) と百寿者群で見いだされた mtSNP を比較した。同時に、比較対照として、若年健常男性 若年肥満男性、一般糖尿病患者 血管病変を伴った糖尿病患者、それぞれ 96 名のミトコントリアゲノムの全塩基配列を決定し、合計 6 群 576 名のミトコントリアゲノムの全塩基配列 (954 万塩基対) のデータに基づいて、ヒトミトコントリアゲノム多型データベース (mtSNP human mitochondrial genome single nucleotide polymorphism database <http://toki.gitb.or.jp/mitsnp/index.html>) を構築した。これはヒトのミトコントリアゲノムの全塩基配列に関する世界最大のデータベースである。

A 研究目的

ミトコントリアゲノムは 16 569 塩基からなる環状 重鎖 DNA であり 2 種のリボソーム RNA 22 種のトランスファー RNA 13 種のメッセンジャー RNA をコードしている。これらによって ミトコン

トリア内において 酸化的リン酸化系の複合体 I-IV の 13 種のサブユニットが合成される。

ミトコントリアは酸素を利用して ATP を合成する。心筋細胞ではその断面積の 33%を占め、神経細胞においても重要な役

割を果たしている。mtDNAは母性遺伝し、活性酸素の主要な発生源であるミトコンドリア内にあるため、老化や各種の病態においてmtDNAの変異が蓄積することか明らかになっている。またアポトーシスの過程や高血糖時の内皮細胞傷害にミトコンドリアが関与していることか注目されている。

一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) か注目されており、我が国では標準 SNP テータベース (JSNP) の整備が進められている。核 DNA は、30 億塩基対のゲノムか 2 対あるのて 60 億塩基対である。核のゲノムには 3-4 万個の遺伝子かあり、その機能している部分は 9000 万塩基対 (15%) である。一方、mtDNA (15 万塩基対) には 37 個の遺伝子か機能しているか、1 個の細胞あたり 2000 コピー存在するので、細胞あたり 3000 万塩基対か機能していることになる。従って mtDNA の機能部分は核 DNA の機能部分の 1/3 となる。ここで、mtDNA の進化速度か核 DNA より 5~10 倍高いことを考慮すると mtSNPs は機能的な重要度において核 DNA の SNPs を凌駕するといえる。

我々は、ミレニアムプロジェクトの一環として、各 96 例からなる 6 群 (百寿者・パーキンソン病患者・一般糖尿病患者・血管病変を伴う糖尿病患者・若年肥満者・若年非肥満者)、合計 576 例のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定し、長寿あるいは疾患に関連する新規の遺伝子多型を探索する計画を進めている。これは科学技術振興事業団の研究情報データベース化事業に基づくものであり、これによって日本人のミトコンドリアゲノ

ムにおける SNPs の全貌が明らかになる。その公開開始予定日は平成 15 年 4 月 11 日である。

B 研究方法

1 対象

百寿者群 (TC および GC) 100 歳以上 85 名の百寿者からなる TC 群は東京の慶応大学医学部老年内科により登録された (女性 60 名、男性 25 名)。11 名の百寿者 GC 群は岐阜県国際ハイオ研究所で登録された (女性 6 名、男性 5 名)。

パーキンソン病群 (PD) 年齢か 62.1 ± 8.9 歳 (39~81 歳) の 96 名のパーキンソン病患者 PD 群は、東京の順天堂大学医学部神経内科で診断された (女性 53 名、男性 43 名)。

アルツハイマー病群 (AD) 年齢か 76.5 ± 9.7 歳 (47~93 歳) の 96 名のアルツハイマー病患者から成る AD 群は、日本医科大学医学部神経内科の関連病院 (千葉県) で診断された (女性 75 名、男性 17 名)。この群については平成 15 年 9 月までに解析し、データベースに含める予定である。

若年肥満男性群 (ON) 体格指数 (BMI) か 30.1 ± 2.5 kg/m^2 年齢か 21 ± 2 歳 (18~25 歳) の 96 名若年肥満男性から成る ON 群は、名古屋の名古屋大学総合保健体育科学センターにおいて登録された。

若年健常男性群 (HN) 体格指数 (BMI) か 20.2 ± 2.3 kg/m^2 年齢か 20 ± 3 歳 (18~25 歳) の 96 名若年健常非肥満男性から成る HN 群は、名古屋の名古屋大学総合保健体育科学センターにおいて登録された。

名古屋糖尿病群 (ND) 年齢が 58 ± 5 歳 (43~65 歳) の 96 名の 2 型糖尿病患者から成る ND 群は、名古屋の名古屋大学総合保健体育科学センターにおいて登録された (女性 42 名、男性 54 名)。

東京の糖尿病群 (TD) 年齢が 65 ± 10 歳 (43~92 歳) の 96 名の 2 型糖尿病患者から成る TD 群は、東京の順天堂大学医学部内科において登録された (女性 48 名、男性 48 名)。

長期縦断研究の対象は愛知県大府市および知多郡東浦町の住民からの無作為抽出者 (観察開始時 40-79 歳) で事前の説明会において父兄による同意 (インフォームド コンセント) を得られた者である。初回調査は平成 9 年度から開始し、40 歳から 79 歳までの 2267 名を対象に平成 12 年 4 月までに終了した。平成 12 年度からは第 2 回目の調査を行っており、以後 2 年ごとに背景因子や老年病の発症・進展についての観察を行っている。

2 検査および調査項目

長期縦断研究における観察項目は、医学 形態学 運動生理学 栄養学 心理学各分野の専門家により選定された縦断的調査に耐えうる信頼性、妥当性の高いもので、例えば栄養関連だけでも 430 項目、全体では数千項目にも及ぶ。

(1) 医学分野 生活調査 (喫煙 飲酒、生活環境 経済状況 予歴 初経 閉経など)、病歴調査 使用薬物調査、血液・尿検査、頭部 MRI 安静時心電図、頸動脈エコー 指尖脈波 心エコー 眼科 耳鼻科各種検査 骨密度検査など

(2) 身体組成 体脂肪率、超音波による脂

肪厚・筋肉厚測定、腹腔内脂肪量 (腹部 CT) など

(3) 運動生理学分野 体力計測、重心動揺、3 次元歩行分析、身体活動調査、モーショントラッキングなど

(4) 栄養学分野 食物摂取頻度調査 食習慣調査 3 日間食事記録調査 (秤量法 写真記録併用) など

(5) 心理学分野 知能 (WAIS-R-SF MMSE) ライフイベント、パーソナリティ 情動など

3 ミトコンドリアゲノムの全塩基配列の決定と mtSNP 解析

対象者の血液細胞あるいは口腔粘膜細胞から DNA を抽出した。ミトコンドリア DNA を 6 本の DNA 断片として一次増幅した。一次増幅産物から 600-1000 塩基対の 60 本の二次増幅産物を得た。二次増幅産物を精製し BigDye terminator 法によりシーケンシング反応を行い ABI 社の DNA シーケンサー Prism 310/377 を用いて、塩基配列を決定した。一部は DragonGenomics 社および Shimadzu 社において塩基配列を決定した。シーケンシングデータは約 300 塩基対の間隔で、互い重なり合う 600-1000 塩基対の情報として得られ、一個の mtSNP は独立に増幅された 2-3 本の DNA 断片において確認されたものである。分析の詳細については mtSNP データベースの Technical Annex に記載している。長期縦断研究の対象者における多型分析には 384 ウェル SNP プレートを使い 東洋紡シーンアナリシス社の自動塩基置換検出装置 HybriGene にて各 mtSNP を検出した。参

加者のほぼ全員の DNA を抽出し保存してあり、これを用いて検査を行っている。

4 調査実施方法

長期縦断研究においては、検査・調査は2年間で2400名、年間1200名を実施するために、一日6名で火曜から金曜までの週4日、年間200日の検査を実施する。2年ごとに追跡を行い、出来るだけ長期にわたる継続的な研究を目指す。対象集団は転居や死亡などで追跡が不能になった参加者の数だけ補充する動的コホートとしていく。またコホートが全体として高齢化しないように40歳の参加者を新規に加えて定常状態として約2,400人のコホートとする。

(倫理面への配慮)

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して行っている。MISNP データベースに関する研究は岐阜県国際ハイオ研究所およびそれぞれの共同研究機関の倫理委員会での研究実施の承認を受けた上で実施し、試料は連結不可能匿名化を行った。長期縦断研究に関しては、国立中部病院における倫理委員会での研究実施の承認を受けた上で実施し、調査の対象者全員から遺伝子検査の実施および検体の保存を含むインフォームトコンセントを得ている。また同一の人に対して繰り返し検査を行っており、その都度インフォームトコンセントにて本人への確認を行っている。

C 研究結果

長寿に関連する遺伝的中庸性

ミトコンドリアケ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。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。

百寿者群では9種の異なったアミノ酸置換が見いたされたのに対し、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たされた。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「改訂版ケンフリノシ標準配列」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(I178T, 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個体ずつに見いたされた。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たされた。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個体において見いたされた。

標準アミノ酸配列からの逸脱程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 か各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 か各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 か5個体 114 89 89 87 78 か各1個体、58 か5個体 46 29 27 27 23 22 か各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かった ($p = 0.0058$ 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 (オノス比=6.33 $p = 0.036$, Fisher の直接法)。これらの観察結果は N260D 置換を有することか長寿につながることを示唆しているか、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 蛋白質におけるユヒキノンの外側結合部位 (Qo site) に位置しており、ユヒ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 か 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、ユヒキノンの 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。

肥満に関連するミトコンドリア遺伝子多型

我々は、肥満学生を対象とした調査において、個体の肥満度 (BMI) は父親の BMI より母親の BMI の影響を受けることを明らかにしている。また、Stunkard ら⁹⁾ は、個体の BMI は生物学的父親の BMI より生物的母親の BMI の影響を受け、養子の BMI においては養親の BMI の影響を受けないことを報告している。これらの報告は、母性遺伝によって伝えられた mtDNA の遺伝子型が肥満度に関与している可能性を示唆しているものである。

各々 96 例の若年肥満者および非肥満者の mtDNA 全塩基配列 (16, 569 塩基×192 例=318 万塩基) を決定した結果、759 個の mtSNP が検出され、22 塩基に 1 個の割合で mtSNP が見つかった。mtDNA の翻訳領域において肥満および非肥満に関連する mtSNP は、それぞれ 15 および 4 個認められた。また、これらの mtSNP は互いに連鎖しているものか多く、肥満に関連する 2 つのハプログループと非肥満に関連する 1 つのハプログループの計 3 つの群に分類された。ハプログループ M7b2 を代表とする 5 個の同義置換と 5 個のアミノ酸置換 (ND1 Asp→Asn, ND2 Ala→Thr, C02 Val→Ile, ND3 Ile→Thr, ND5 Tyr→His)、ならびにハプログループ Ala を代表とする 4 個の同義置換と 1 個の挿入 (16S rRNA) は非肥満群に比較し肥満群で有意に高頻度であった ($p=0.03$)。一方、ハプログループ F に代表される 2 個の同義置換と 2 個のアミノ酸置換 (ND5 Ser→Thr, Val→Ile) は非肥満群に比較し肥満群において有意に低頻度であった ($p=0.02$)。また、非翻訳領域 (D-ループ) においては肥満および非肥満に関連する

mtSNP は、それぞれ 4 および 3 個認められた。D-ループにおいて、肥満と非肥満の多型頻度に差が生じていたとしてもその解釈は難しい。なぜなら、D-ループの多型の多くは集団の中でランダムに生じているからである。Rivera ら¹⁰⁾ は BMI に及ぼす D-ループの KpnI 制限酵素サイト (G16129A) の影響を検討し、G16129A 多型は肥満に関連しないと報告した。肥満に関連したハプログループ M7b2 は、完全に G16129A 多型と連鎖していた。しかし、この G16129A 多型はハプログループ M7b2 だけでなく他のハプログループにおいても多数生じており、その多型頻度は両群とも同一であった (96 例中 11 例)。今回、我々は、D-ループだけでなく 13 種の mRNA、2 種の rRNA、および 22 種の tRNA を含む mtDNA の全塩基配列を解析したことによって肥満に関連する mtSNP の全貌を把握することかてきた。今後、本研究で認められた肥満または非肥満に関連した mtSNP が真の肥満関連遺伝子多型であるかどうかを検討するために大規模症例対照比較研究ならびに長期縦断疫学研究が必要である。

15497G>A (Cytb, G251S) 多型と女性における肥満との関連

百寿者 96 名とパーキンソン病患者 96 名における頻度比較において、15497G>A (Cytb, G251S) 多型は、百寿者で 1 名に対しパーキンソン病患者で 6 名と、パーキンソン病患者で頻度が高い傾向が認められた (オッズ比 6.33 $p=0.059$)。15497G>A はハプログループ G3 を代表する多型であり、他の複数の mtSNP を伴っ

ていた。この多型を国立長寿医療研究センター (National Institute for Longevity Sciences NILS) の老化に関する長期縦断研究 (NILS-Longitudinal Study of Aging NILS-LSA) の対象者において分析した結果、この 15497A 多型が女性における肥満と関連していることが明らかになった (Ohkura et al 投稿準備中)。対象は愛知県大府市および知多郡東浦町の住民からの無作為抽出者 (観察開始時 40-79 歳) で事前の説明会において文書による同意 (インフォームド・コンセント) を得られた者である。15497G>A (Cytb G251S) 多型の分析は 384-well SNP プレートを使い 東洋紡シーナナリシス社の自動 - 塩基置換検出装置 HybriGene を用いて検出した。初回調査は平成 9 年度から開始し、40 歳から 79 歳までの 2267 名を対象に平成 12 年 4 月までに終了した。男性では 15497G 多型を有する対象者の BMI [23.1 ± 0.1 ($n = 869$)] と 15497A 多型を有する対象者の BMI [23.4 ± 0.5 ($n = 37$)] との間で有意差はなかったが、15497G の女性における BMI が 22.8 ± 0.1 ($n = 802$) であったのに対し、15497A の女性の BMI は 24.8 ± 0.7 ($n = 23$) と有意に高かった ($p < 0.005$)。

長寿に関連する 12S rRNA 多型を伴うハプログループ D4b2

百寿者 96 名とパーキンソン病患者 96 名における頻度比較において、12S rRNA 遺伝子の A>C 多型は、百寿者で 18 名に対しパーキンソン病患者で 6 名とパーキンソン病患者での頻度が有意に高かった (オッズ比 3.46 $p = 0.008$)。この A>C

transversion 多型は、12S rRNA の第 45 番のステム構造において、ワトソン-クリック塩基対 T=A を非ワトソン-クリック塩基対 T=C に変化させるのでこのステム構造が小さくなると推定される。この 12S rRNA 遺伝子の A>C 多型は ATP6 遺伝子と CO3 遺伝子のそれぞれ 1 カ所の同義置換と連鎖していた。さらに、1998 年に長寿に関連することを報告した 5178C>A (ND2 L237M) 多型はパーキンソン病患者 96 名中 39 名において検出されたのに対し百寿者で 107 名中 57 名において検出され百寿者での頻度が有意に高かった (オッズ比 1.67 $p = 0.048$)。これらの mtSNP はハプログループ D4b2 に属し、ハプログループ D に共通な mtSAP (ミトコンドリア単一アミノ酸置換) 以外に特異なアミノ酸置換がないということか特徴である。ハプログループ D4b2 は遺伝的中庸性を有していると考えられる。

8794C>T (ATP6, H90Y) 多型と男性における高い認知能との関連

若年健常男性 96 名と若年肥満男性 96 名における頻度比較において 8794C>T (ATP6 H90Y) 多型は、若年健常男性で 6 名に対し若年肥満男性で 1 名と健常男性で頻度が高い傾向が認められた (オッズ比 6.33 $p = 0.059$)。8794C>T はハプログループ A を代表する多型である。この多型を国立長寿医療研究センター (National Institute for Longevity Sciences NILS) の老化に関する長期縦断研究 (NILS-Longitudinal Study of Aging NILS-LSA) の対象者において分析

した結果、この 8794T 多型が男性における高い認知能と関連していることが明らかになった(Tanaka et al 投稿準備中)。対象は愛知県大府市および知多郡東浦町の住民からの無作為抽出者(観察開始時 40-79 歳)で事前の説明会において文書による同意(インフォームト・コンセント)を得られた者である。8794C>T(ATP6, H90Y)多型の分析は 384-well SNP プレートを使い、東洋紡シーナナリシス社の自動一塩基置換検出装置 HybriGene を用いて検出した。知能は WAIS-R-SF 法によって測定した。初回調査は平成 9 年度から開始し、40 歳から 79 歳までの 2267 名を対象に平成 12 年 4 月までに終了した。女性では、8794C 多型を有する対象者の IQ [100.5±0.4 (n = 989)] と 8794T 多型を有する対象者の IQ [98.9±1.4 (n = 93)] との間で有意差はなかったか (p = 0.2992)、8794C の男性における IQ が 105.1±0.4 (n = 1015) であったのに対し、8794T の男性の IQ は 110.8±1.5 (n = 80) と 5.7 ポイント有意に高かった (p = 0.0002)。8794T の頻度は男女全体で 8.2% であった。

15524A>G (Cytb, N260D) 多型と男性における高い認知能との関連

百寿者 96 名とパーキンソン病患者 96 名における頻度比較において、15524A>G (Cytb N260D) 多型は、百寿者で 6 名に対しパーキンソン病患者で 1 名と、百寿者で頻度が高い傾向が認められた(オッズ比 6.33 p=0.059)。15524A>G 多型はハプログループ D に属する数個の mtSNP を伴っていた。この 15524A>G 多型を国立長

寿医療研究センターの老化に関する長期縦断研究(NILS-LSA)の対象者において分析した結果、この 15524G 多型が男性における高い認知能と関連していることが明らかになった(Tanaka et al, 投稿準備中)。対象は愛知県大府市および知多郡東浦町の住民からの無作為抽出者(観察開始時 40-79 歳)で事前の説明会において文書による同意(インフォームト・コンセント)を得られた者である。15524A>G (Cytb N260D) 多型の分析は 384-well SNP プレートを使い、東洋紡ジーンアナリシス社の自動一塩基置換検出装置 HybriGene を用いて検出した。知能は WAIS-R-SF 法によって測定した。初回調査は平成 9 年度から開始し、40 歳から 79 歳までの 2267 名を対象に平成 12 年 4 月までに終了した。女性では、15524A 多型を有する対象者の IQ [100.7±0.4 (n = 1015)] と 15524G 多型を有する対象者の IQ [97.5±1.7 (n = 67)] との間で有意差はなかったか (p=0.0661)、15524A の男性における IQ が 105.3±0.4 (n = 1035) であったのに対し、15524G の男性の IQ は 111.1±1.7 (n = 60) と 5.8 ポイント有意に高かった (p = 0.0013)。15524G の頻度は男女全体で 5.8% であった。

糖尿病に抵抗性を示し肥満に関連する mtSNP

若年肥満男性と一般糖尿病患者における頻度比較において、NADH dehydrogenase の第 1 サブユニット (ND1) の Ala→Val 多型が注目された。この多型は一般糖尿病患者 213 名中 2 名において検出されたのに対し、若年肥満男性で 138 名中 6 名

において検出され、若年肥満男性での頻度か有意に高かった（オッズ比 4.80 $p=0.044$ ）。この ND1 の多型はハプログループ B4c2/B4c3 を代表している。この Ala→Val 多型は ND1 の ab ループの哺乳類においてよく保存された部位にあり、ND1 の機能に何らかの影響を与えるものと推定された。

糖尿病に感受性を示し肥満者に頻度の低い mtSNP

若年肥満男性 96 名と一般糖尿病患者 96 名における頻度比較において、ATP 合成酵素の第 6 サブユニット (ATP6) の Thr→Ile 多型は、若年肥満男性で検出されなかったのに対し一般糖尿病患者 5 名において検出され、一般糖尿病患者での頻度か有意に高かった ($p=0.03$)。さらに、症例数を増やすと 若年肥満男性で 138 名中 1 名において検出されたのに対し一般糖尿病患者 213 名中 8 名において検出され、一般糖尿病患者で頻度か高い傾向か認められた (オッズ比 5.3 $p=0.07$)。ATP6 の Thr→Ile 多型はハプログループ M8a1 に属する数個の mtSNP を伴っていた。この Thr→Ile 多型は ATP6 のマトリクス側に存在する ab ループの比較的保存された領域に存在し ATP 合成酵素の機能に何らかの影響を与えるものと推定された。肥満者において頻度か低く一般糖尿病患者において頻度か高い傾向か観察されたことから、この Thr→Ile 多型は糖尿病発症に関わる遺伝的危険因子と考えられた。

D 考察

ミトコントリアケノム進化速度は核ゲノムの進化速度の 5-10 倍速いとされている。例えば、チンパンシーとヒトの核遺伝子の相違は約 1%であるが ミトコントリアケノムの塩基配列の相違は約 9%である。チンパンシーとヒトの間における知能や寿命の相違に、核遺伝子の変化のみならず ミトコントリアケノムの変化が関与している可能性か考えられる。ミトコントリアケノムの塩基配列の相違は、種間のみならず、ヒトの種内でも人きい。父親の精子に由来するミトコントリアは受精卵から排除されるので、ミトコントリアケノムは母親の卵子からのみ伝えられる。組み換えか生しないため、現世人類の共通の祖先（いわゆるミトコントリア イブ）から連綿と母系に沿って伝えられてきたミトコントリアケノムには 人類進化の足跡か遺伝子多型として刻み込まれている。これまで、ミトコントリアケノムの解析は F として個体識別あるいは人類の分子進化学的研究に用いられてきた。分析の手法としては、D-ループ領域と呼ばれる非翻訳領域の塩基配列決定 あるいは制限酵素切断片長多型 (RFLP) の分析か用いられてきた。これらの分析に基づいて、それぞれのヒト個体のミトコントリアケノム遺伝子型をハプログループ (haplogroup) に分類することかできる。しかし、それらのハプログループに伴ってどのようなミトコントリアケノム多型か実際に存在するのか、あるいはそれらの多型によってミトコントリア機能にどのような相違か生しているのかについては 全く不明であった。

ハプログループはミトコントリアケノ

ム上の複数の多型あるいはハプロタイプ (haplotype) 組み合わせをグループ化したもので、アルファベント A, B, C で表される。アフリカ人はハプログループ L1 L2 L3 に分類される。アフリカ人の一部 L3 から派生したのかハプログループ N とハプログループ M である (http://www.mitomap.org/mitomap/WorldMigrations.pdf)。これらのハプログループ N と M は大ハプログループ (macrohaplogroup) とも呼ばれるが、互いに 9 カ所の塩基置換の相違がある。ハプログループ N は主にヨーロッパ人に分布し、ハプログループ M は主にアジア人に分布している。我々の分析によると、日本人においても、大ハプログループ N に分類されるハプログループ A, B, F などが検出された。一方、大ハプログループ M に属するハプログループ D, G, M7a, M7b, M8 が日本人において検出された。

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。

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る。

ミトコンドリアゲノム多型と認知能に関する考察 今回、2 種の互いに独立した mtSNP (合計の頻度 14%) が男性における高い認知能と関連していることが明らかになった。血糖は肝臓の糖新生系によって維持されているか、血中のグルコースか脳の主要なエネルギー源である。グルコースは神経細胞内に取り込まれ、解糖系によってピルビン酸となり、ミトコンドリアに供給される。脳の酸素消費は安静時における全身の酸素消費の 20% を占める。従って、ミトコンドリアは脳の高次機能を支えるという重要な役割を果たしている。ミトコンドリアの遺伝子型が個体間の認知能の相違に大きな影響を及ぼしているというこの新しい発見は、十分理解できる。一方、なぜ男性のみに有意差が認められたのか、その要因は不明である。使用された IQ 測定方法は図形や数字に関して一定時間内に判断を下す能率を評価するものであり、女性より男性において高い得点が得られる傾向が認められる。ミトコンドリア機能と脳機能の性差の間にとのような関連があるかに

については 今後の検討を要する。

E 結論

加齢に伴って発症する神経変性疾患の代表としてパーキンソン病を選び 96 例の患者についてミトコントリアケノムの全塩基配列を決定した。一方、百寿者 96 名のミトコントリアケノムの全塩基配列を決定し、パーキンソン病患者群で見いだされたミトコントリアケノム一塩基多型 (mtSNP) と百寿者群で見いだされた mtSNP を比較した。同時に、比較対照として 若年健常男性、若年肥満男性、一般糖尿病患者、血管病変を伴った糖尿病患者、それぞれ 96 名のミトコントリアケノムの全塩基配列を決定し、合計 6 群 576 名のミトコントリアケノムの全塩基配列 (954 万塩基対) のデータに基づいて、ヒトミトコントリアケノム多型データベース (mtSNP human mitochondrial genome single nucleotide polymorphism database <http://toki.glib.or.jp/mtsnp/index.html>) を構築した。これはヒトのミトコントリアケノムの全塩基配列に関する世界最大のデータベースである。

F 研究発表

1 論文発表

英文論文

1 Shimokata H Yamada Y Nakagawa M Okubo R Saido T Funakoshi A Miyasaka K Ohta S Tsujimoto G Tanaka M Ando F Niino N Distribution of geriatric disease-related genotypes in the

National Institute for Longevity Sciences Longitudinal Study of Aging (NLS-LSA) J Epidemiol 10 S46-55 2000

2 Shin WS Tanaka M Suzuki J Hemmi C Toyo-oka T A novel homoplasmic mutation in mtDNA with a single evolutionary origin as a risk factor for cardiomyopathy Am J Hum Genet 67 1617-1620 2000

3 Tanaka M Gong J Zhang J Yamada Y Borgeld H Yagi K Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis Mech Ageing Dev 116 65-76 2000

4 Tanaka M Yagi K Common rare and individual variations of mitochondrial DNA associated with diseases or longevity J Clin Biochem Nutr 28 191-199 2000

5 Miura J Uchigata Y Gong J-S Zhang J Iwamoto Y Yagi K Tanaka M Mitochondrial genotype Mt5178C is associated with diabetic nephropathy in Japanese type-1 diabetic patients in Diabetes Mellitus Recent Advances for the 21st Century M Shichiri S Shinn N Hotta Editors Elsevier Science Tokyo 2000 pp 271-274

6 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
- 7 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
- 8 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
- 9 Tanaka M Mitochondrial DNA Polymorphisms and Aging Environ Mutagen Res 23 197-205, 2001
- 10 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
- 11 Tsuboi M, Hisatome I, Morisaki T, Tanaka M, Tomikura Y, Takeda S, Shimoyama M, Ohtahara A, Ogino K, Igawa O, Shigemasa C, Ohgi S, Nanba E Mitochondrial DNA deletion associated with the reduction of adenine nucleotides in human atrium and atrial fibrillation Eur J Clin Invest 31 489-496 2001
- 12 Umetsu K, Tanaka M, Yuasa I, Saitou N, Takeyasu I, 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
- 13 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
- 14 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
- 15 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
- 16 Tanaka M Mitochondrial genotypes and cytochrome b variants associated with longevity or Parkinson's disease *J Neurol* 249 11/11-11/18 2002
- 17 Tanaka M Borgeld H-J Zhang J Gong J-S Yoned M Maruyama W Naoi M Ibi T Sahashi K Shamoto M Fuku N Kurata M Yamada Y Nishizawa K Akao Y Ohishi N Miyabavashi S Umemoto H Muramatsu T Furukawa K Kikuchi A Yagi K Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease *SmaI* into mitochondria *J Biomed Sci* 9 534-541 2002
- 18 Tanaka M Fuku N Takeyasu T Guo L-J Hirose R Kurata M Borgeld H-J Yamada Y Maruyama W Arai Y Hirose N Oshida Y Sato Y Hattori N Mizuno Y Yagi K Golden mean to longevity Rareness of mitochondrial cytochrome b variants in centenarians but not in patients with Parkinson's disease *J Neurosci Res* 70 347-355 2002
- 19 Uchigata Y Okada T Gong J-S Yamada Y Iwamoto Y Tanaka M A mitochondrial genotype associated with development of autoimmune-related type-1 diabetes *Diabetes Care* 25 2106 2002
- 20 Yamada Y Fujisawa M Ando F Niino N Tanaka M Shimokata H Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with blood pressure in Japanese individuals *J Hum Genet* 47 243-8 2002
- 21 Yamada Y Ichihara S Takatsu F Ishihara H Hirayama H Sone T Tanaka M Yokota M Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes *N Engl J Med* 347 1916-1923 2002
- 22 Yamamoto T Maruyama W Kato Y Yi H Shamoto-Nagai M Tanaka M Sato Y Naoi M 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
- 和文論文
- 1 田中雅嗣 ミトコントリアと老化 *BIO Clinica* 15 214-219 (2000)
- 2 田中雅嗣 ミトコントリアからのメノセーシ 長寿に関連したミトコン

- トリア遺伝子多型と成人発症性疾患
日本農芸化学会誌 74 783-786 (2000)
- 3 田中雅嗣 ミトコントリア心筋症
目て見る循環器病シリーズ 14 心筋
症 (松永昭編) pp 188-191 Medical
View社 (2000)
 - 4 田中雅嗣 ミトコンドリア遺伝子変
異の蓄積と老化 環境変異原研究
23 197-205 2001
 - 5 田中雅嗣 活性酸素によるミトコン
トリア DNA の変異発生 新ミトコン
トリア学 (内海耕慥、井上正康編)
p 270-277 共立出版 (2001)
 - 6 田中雅嗣 ミトコンドリア特性と長
寿者 新ミトコンドリア学 (内海耕
慥、井上正康編) p 364-368 共立
出版 (2001)
 - 7 田中雅嗣 ミトコントリア病の遺伝
子治療 新ミトコントリア学 (内海
耕慥、井上正康編) p 369-375 共
立出版 (2001)
 - 8 田中雅嗣 ピルヒン酸のエタノール
代謝促進とミトコンドリア機能補完
効果 日本アルコール・薬物医学会
雑誌 36 272-273, 2001
- 2 学会発表
国際学会
- 1 Tanaka M Mutations and
polymorphisms of mitochondrial DNA
in cardiomyopathy The
Cardiomyopathy 2000, The Seventh
Antwerp - La Jolla - Kyoto Research
Conference on Cardiac Function (Feb
24-26 2000) Kyoto
 - 2 Tanaka M Polish-Japanese Free
Radical Forum on Molecular Aspects
of Free Radical Dependent Processes
in Cell Death and Survival
September 17-19 2000, Gdanisk
 - 3 Tanaka, M Mitochondrial genotype
associated with longevity and its
inhibitory effect on mutagenesis
3rd Human Genome Organization
Pecific Meeting and 4th
Asia-Pacific Conference on Human
Genetics, Disease-related Genomics
October 18-21, 2000, Shanghai
 - 4 Tanaka M & Yagi K Human
mitochondrial genotype associated
with longevity and its inhibitory
effect on mutagenesis The third
International Conference on
Oxygeneses Oxygen and Life -
Oxygenases Oxidases, and Lipid
Mediators - November 26-29 2000,
Kyoto
 - 5 Tanaka M Human mitochondrial
genotype associated with longevity
and its inhibitory effect on
mutagenesis 1st Conference of
Korean Genome Organization Recent
Progress in Genomics Proteomics
and Biotechnology November 29
2000 Seoul
 - 6 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 Moleculer

- Gerontology Melbourne March 19
2001
- 7 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
- 8 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
- 9 Tanaka M Single nucleotide
polymorphisms of mitochondrial DNA
associated with longevity
International Workshop on
Mitochondria Taipei August 14
2001
- 10 Tanaka M Gene therapy for
mitochondrial disease
International Workshop on
Mitochondria Kaushung August 17
2001
- 11 Tanaka M Mitochondrial genome
polymorphisms associated with
obesity thinness and diabetes
mellitus The First Scientific
Meeting of Asian Society of
Mitochondrial Research and Medicine
(Plenary Lecture 1) Seoul
February 5 2003
- 国内学会
- 1 田中雅嗣 長寿に関連するミトコン
トリア遺伝子型とその変異抑制効果
第 64 回日本生化学会中部支部例会
2000 年 5 月 13 日 静岡
- 2 田中雅嗣 ミトコントリア遺伝子と
長寿 第 62 回老年学公開講座
2000 年 9 月 22 日 東京
- 3 田中雅嗣 ミトコントリア遺伝子と
長寿 静岡長寿フォーラム 2000 年
10 月 6-7 日 静岡
- 4 福 典之、押田芳治 武安岳史、郭
麗君、田中雅嗣 佐藤祐造 ミトコ
ントリア遺伝子型 Mt5178C は青年男
子において高度肥満に関連する 第
21 回日本肥満学会 2000 年 10 月
19-20 日 名古屋
- 5 押田芳治 福 典之、武安岳史 佐
藤祐造、田中雅嗣 ミトコントリア
遺伝子レベルからのアプローチ 第
21 回日本肥満学会パネルディスカ
ション 3 「生活習慣病へのアプロ
ーチ」 2000 年 10 月 19-20 日 名
古屋
- 6 田中雅嗣 ミトコントリア遺伝子変
異の蓄積と老化 2001 年度日本変異
原学会公開シンポジウム 東京、2001
年 5 月 26 日
- 7 田中雅嗣 ヒルヒン酸のエタノール
代謝促進とミトコントリア機能補完
効果 第 36 回日本アルコール 薬物
医学会 教育講演、東京、2001 年 10
月 11 日

- 8 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トリア 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, 2001 年 4 月 16 日
- 9 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トリア 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, 2001 年 10 月 25 日
- 10 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 およびヒトクローム b 遺伝子多型の特徴 第 1 回日本ミトコントリア研究会, 一般演題, 川崎, 平成 14 年 1 月 31 日
- 11 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トリア遺伝子 (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, 2001 年 9 月
- 12 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トリア 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
- 13 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トリア 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
- 14 田中雅嗣 加齢、ミトコントリア、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, 2001 年 10 月 27 日
- 15 田中雅嗣 ヒトケノム — 総論 — 長寿に関連するミトコントリアゲノム多型, 第 49 回日本体力学会 高知大会 シンポジウム IV 2002 年 9 月 29 日 高知 (口演)
- 16 田中雅嗣、福典之、押田芳治、武安岳史、郭麗君、新井康通、廣瀬信義、服部信孝、水野美邦 長寿・糖尿病 パーキンソン病に関連するミトコンドリアゲノム多型の探索, 第 75 回日本生化学会大会 シンポジウム 3S-53 「ミトコントリアと疾患」 2002 年 10 月 16 日 京都 (口演)
- 17 社本雅代、西谷弘美、小塚真弓、磯部健一、大澤俊彦、田中雅嗣、直井信、丸山和佳子 ミトコンドリア不全によるパーキンソン病の細胞死モデル, 第 75 回日本生化学会大会 ポスター 2P-638 2002 年 10 月 15 日 京都
- 18 福典之、押田芳治、武安岳史、郭麗君、倉田美由紀、廣瀬信義、新井康通、佐藤祐造、田中雅嗣 肥満者におけるミトコントリア Cytochrome b および ATP6 遺伝子多型の解析, 第 75 回日本生化学会大会 ポスター 2P-723 2002 年 10 月 15 日 京都
- 19 田中雅嗣 肥満・糖尿病 マラソン適性に関連するミトコントリアゲノ

- ム多型の探索 第 13 回日本臨床スポーツ医学会 教育講演 IL-1-1 生化学 ―ミトコントリア遺伝子解析を中心に― 2002 年 11 月 2 日 名古屋 (口演)
- 20 田中雅嗣 ミトコントリアゲノム多型解析 医子から考古学へ 第 1 回 DNA 考古学研究会 2002 年 12 月 6 日 京都 (口演)
- 21 福 典之, 押田芳治 武安岳史, 倉田美由紀, 佐藤祐造, 田中雅嗣 青年期肥満に関連するミトコントリア遺伝子多型の探索, 第 2 回日本ミトコントリア研究会 2002 年 12 月 19 日 東京 (口演)
- 22 千田淳司, 市貝愛子, 田中雅嗣, 前田靖男 発生研究モデルとしての細胞性粘菌ミトコントリアゲノム欠損株の有用性 第 2 回日本ミトコントリア研究会 2002 年 12 月 19 日 東京 (口演)

厚生科学研究費補助金（厚生労働省ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

パーキンソン病の危険因子とミトコントリア蛋白

分担研究者 太田成男 日本医科大学老人病研究所教授

研究要旨 パーキンソン病患者と対照健常人の DLST (dihydroalipoamide succinyltransferase) 及び ALDH2 (アルデヒド脱水素酵素 2) の遺伝子多型頻度を比較すると、パーキンソン病患者の多型頻度はアルツハイマー病と健常人の中間に位置した。次いで、神経細胞死における ALDH2 酵素活性の役割を培養細胞を用いて検討したところ、ALDH2 活性欠損株は酸化ストレスによって生じる 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) の解毒能が低下し、細胞死が促進された。以上の結果から、ALDH2 の活性欠損型がアルツハイマー病やパーキンソン病の危険因子となるのは、この欠損により酸化ストレスに対する抵抗性が低下しているためと考えられる。同様に 4-HNE の代謝に関係すると考えられる ADH2 (アルコール脱水素酵素 2) の遺伝子多型を健常人と比較したところ、男性において低活性型でラクナ梗塞と脳梗塞の増加が認められた。また、トランスフェリンの多型 C2 型の女性が閉眼時の身体の前の揺れ等が、変異をもつ者が有意に強かった。SOD2 (スーパーオキシドシスムターゼ) 遺伝子では、ミトコントリア移行シグナルのアミノ酸変異を伴う遺伝子多型をもつ女性には脳萎縮、脳室拡大が見られた。

A 研究目的

パーキンソン病の危険因子候補として、ミトコンドリア機能低下や酸化ストレスが挙げられている。MPTP はパーキンソン病様症状をおこすことが知られており、ミトコントリアの呼吸鎖複合体 I とクエン酸回路の α -ケトグルタル酸脱水素酵素 (KGDH) の阻害剤となる。また、KGDH 成分の DLST (dihydroalipoamide succinyl-transferase) 量がパーキンソン病患者脳では減少している。さらに、酸化ストレスの指標となる 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) がアルツハイマー病患者脳と同様にパーキンソン病患者脳でも蓄積していることが報告されている。そこで、パーキンソン病患者の DLST 遺伝子産物と 4-HNE の代謝に関与する可能性のある ALDH2 の遺伝子多型を健常人と比較した。さらに ALDH2 活性欠損細胞を作製し、4-HNE に対する耐毒性を解析した。この ALDH2 と同様に 4-HNE の代謝に関連すると考えられる ADH2 の遺伝子多型と表現型の相関関係について調査した。また、ミトコントリアの活性酸素除去酵素 SOD2 の遺伝子多型と表現型の相関関係についても調査した。

B 研究方法

パーキンソン患者の DLST および ALDH2 遺伝子多型を調べた。DLST 遺伝子では全長の DLST の他にイントロン 7 から転写を開始する遺伝子産物 POSTD が存在する。パーキンソン患者の脳

(大脳皮質) の POSTD mRNA 相対含量を調べた。POSTD mRNA の定量にはイントロン 7 のプローブとエクソン 8 のプローブで挟み、TaqMan 法で定量した。ALDH2 遺伝子多型はミスマッチ PCR と制限酵素切断、電気泳動によって決定した。DNA 試料については、下記に述べるように倫理面に配慮して採取した。また、長寿医療研究センター長期縦断参加者の遺伝子を対象にトランスフェリン遺伝子、SOD 遺伝子および ADH2 遺伝子多型を調べた。

ALDH2 欠損株の作製には、マウス正常 ALDH2 cDNA および酵素活性欠損型 cDNA を挿入したベクターを用意し、PC12 細胞に導入した。構成的に発現している細胞株を分離し、4-HNE およびミトコンドリア呼吸鎖阻害剤アンチマイシン A の効果を調べた。

(倫理面への配慮)

パーキンソン病患者 DNA は、順天堂大学脳神経内科において患者の同意の下に採取した血液から分離した試料を恵与された。連結不可能試料であり、個人の特長は不可能の状態となっている。

一般住民 DNA は、長寿医療センター疫学研究部が長期縦断研究に用いている試料であり、中部病院の倫理委員会の承認を得ている。

C 研究結果

DLST と ALDH2 遺伝子多型を調べ、アルツハイマー病患者と健常人と比較すると、アルツハイ