

1. 遺伝子多型によって生じる ドミナント・ネガティブ型 ALDH2

アルデヒド脱水素酵素はヒトにおいて少なくとも 16 個の異なる遺伝子からなる大きなファミリーを形成しており、その発現分布と基質特異性から、それぞれが多様なアルコール、アルデヒド代謝系に組み込まれている (Vasiliou & Pappa, 2000). この中で、ALDH2 遺伝子は染色体 12q24.2 上にあり、ミトコンドリアのマトリックスに局在するホモ 4 量体からなる酵素をコードする。ALDH2 には活性型の ALDH2*1 と不活性型の ALDH2*2 が存在し、両者の構造的な違いは 1 塩基置換によって 487 番目のグルタミン酸がリジンに置き換わった点である (Yoshida, et al, 1984). ALDH2*1 からなるホモ 4 量体のうち一つでも ALDH2*2 に置き換わると、構造変化によって補酵素である NAD⁺ との結合能が低下して酵素活性が失われる (Larson, et al, 2005). すなわち、ALDH2*2 はドミナント・ネガティブに働き、仮に ALDH2*

1 と ALDH2*2 が同じ割合で存在すれば、酵素活性は 1/16 となる (図 1). この ALDH2 は低濃度のアセトアルデヒドを基質とすることができ、飲酒時においてエタノールがアルコール脱水素酵素 (ADH) によって酸化されることで生じるアセトアルデヒドを ALDH2 がさらに酸化して酢酸とし、エネルギー源に変えることができる。この為、ALDH2 活性が低いと飲酒時にアセトアルデヒドが蓄積し、紅潮、悪心、頻拍といったいわゆる“お酒に弱い人”に特徴的な症状を呈する。不活性型の ALDH2*2 アレルを保有するのは東アジア系人種に限定され、日本人の場合は約 40% が ALDH2*2 アレルを一つ以上保有し、さらに約 10% が ALDH2*2 ホモで ALDH2 活性をまったく持たない (Takeshita, et al, 1994).

2. ALDH2*2 アレルは晩期発症型 アルツハイマー病の危険因子

65 歳以上で発症した AD 患者 472 名と対照群として非認知症者 472 名の ALDH2 遺伝子

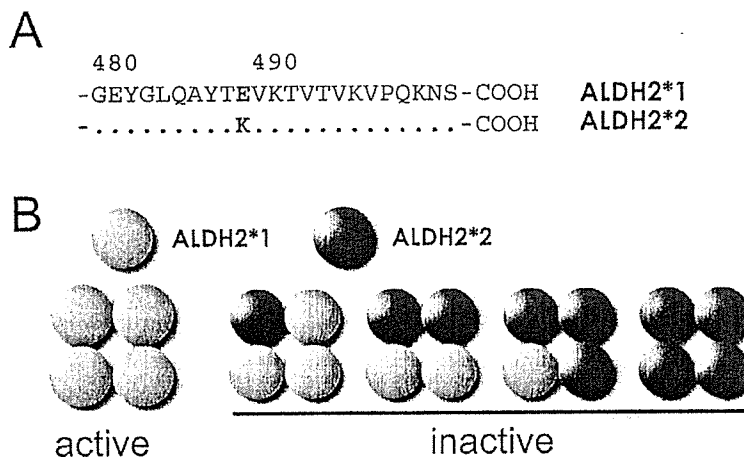


図 1. ALDH2 遺伝子多型
A: ALDH2 の C 末端アミノ酸配列。ALDH2 遺伝子の 1 塩基置換により、活性型 (ALDH2*1) と不活性型 (ALDH2*2) になる。B: ALDH2 は単一サブユニットからなる 4 量体を形成する。サブユニットのうち一つでも不活性型になると酵素活性は失活するため、ALDH2*2 はドミナント・ネガティブに働く。

表 1. AD 患者と対照者の ALDH2 遺伝子型頻度

Subjects	Number of genotype [frequency]			
	1/1	1/2	2/2	1/2 & 2/2
Patients (n=447)	232 [0.519]	183 [0.409]	32 [0.072]	215 [0.481]*
Controls (n=447)	280 [0.626]	138 [0.309]	29 [0.065]	167 [0.374]

ALDH2*1 アレルと ALDH2*2 アレルの頻度は AD 患者で 0.724 と 0.276 であったのに対し、対照者では 0.781 と 0.219 であった ($p=0.005$), * $p=0.001$, OR=1.6 (95% C.I.=1.19-2.03).

多型を解析した (Kamino, et al, 2000), ALDH2 遺伝子多型は各国で比率が大きく異なるが, 日本国内でも地域差がある, また, 老年病に関わる遺伝子多型の頻度は高齢になるにつれ変化することも予想される. そこで, 対照群は, 男女比, 年齢のみならず地域についてもこれをそろえて比較した. その結果を表 1 に示す. AD 患者では少なくとも一つ以上 ALDH2*2 アレルを保有する者の割合が 48.1% であったのに対し, 非認知症者では 37.4% に過ぎなかった. この時のオッズ比は 1.6, p 値は 0.001 で十分に有意である. 男女別々に解析しても同様の結果となり, 性差は認められなかった.

さらに晩期発症型 AD の危険因子として知られるアポリポ蛋白 E (ApoE) について解析したところ, APOE $\epsilon 4$ アレルの AD 発症頻度に対するオッズ比は 3 であった. この APOE 遺伝子多型と ALDH2 遺伝子多型を組み合わせると比較した結果を図 2 に示す. この結果から, APOE $\epsilon 4$ と ALDH2*2 の両アレルを共に保有する場合には AD 発症頻度が相乗的に高くなることが判明した. とくに APOE $\epsilon 4$ ホモで少なくとも一つ以上の ALDH2*2 アレルを保有する者は, どちらも保有していない者に比べ, 31 倍も AD 発症頻度が高い. この条件に一致する者は日本人の約 1% と推定され, 計算上, ほぼ確実に AD を発症することになる. また, APOE $\epsilon 4$ と ALDH2*2 の相乗効果により発症年齢も有意に早くなっていた.

これらの結果は, 病理学的に確定診断した後

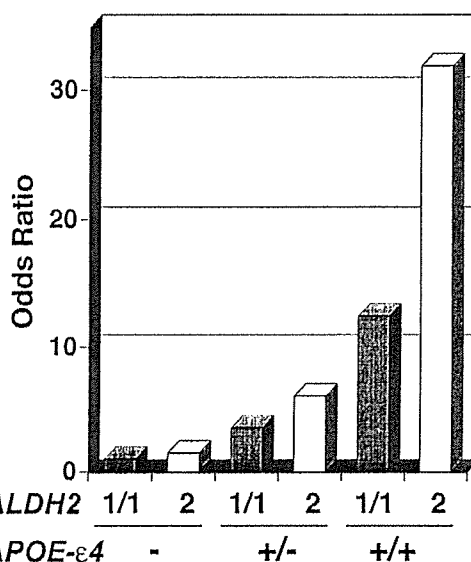


図 2. 孤発性アルツハイマー病における ALDH2*2 と APOE $\epsilon 4$ の発症危険性にたいする相乗効果
ALDH2 の (1/1) は ALDH2*1 アレルをホモで保持する者を (2) は ALDH2*2 アレルをヘテロまたはホモで保持する者を表す. APOE $\epsilon 4$ の (-) は $\epsilon 4$ アレルを保持しない者を, (+/-) はヘテロで, (+/+) ホモで保持する者をそれぞれ表す. ALDH2*2 アレルを持ち, APOE $\epsilon 4$ アレルがホモの者では, どちらも保持しない者に対して, AD 発症のオッズ比が 31 倍になる.

の患者試料を用いた筑波大の玉岡らの研究でも ALDH2*2 アレルが AD の危険因子であること, APOE $\epsilon 4$ による相乗効果があることについて再現性が確認されている (Tamaoka, et al,

2003 日本痴呆学会)。一方、韓国でも AD の危険因子として *ALDH2* 遺伝子多型が着目されて解析が行われたが、認知能力と ALDH 活性の間には相関がないと報告されている (Kim, et al, 2004)。しかし、この報告では AD 患者わずか 60 名について解析したが統計的な有意差が認められなかったとしており、十分な数を検討したとは言えない。

3. *ALDH2**2 アレルと酸化ストレスの増大

ALDH2 遺伝子多型はアルコールに対する感受性を大きく変えることから、*ALDH2**2 アレルを保持する人はアルコール依存症やアルコール性肝炎などの過度のアルコール摂取による疾患に罹患している率は低い (Goedde, et al, 1992)。一方、*ALDH2**2 アレルは糖尿病、腫瘍、高血圧、心筋梗塞の危険因子であることも報告されている (Suzuki, et al, 1996; Yokoyama, et al, 1998; Takagi, et al, 2001; Amamoto, et al, 2002)。しかし、*ALDH2* の遺伝子多型は飲酒という生活習慣と密接に関連しているので、遺伝子多型の影響なのか、遺伝子多型に影響された飲酒による効果なのか区別することは難しい。この区別はたいへん重要である。予防という観点から、飲酒を勧めるべきかどうかに関わってくるからである。そこで、アルコール摂取による影響を除外した場合に *ALDH2**2 アレルを保有する人には何らかの変化があるかを厳密に調査することにした。長寿医療研究センター疫学研究部による大規模疫学調査 (Shimokata, et al, 2000) で、地域住民から無作為に抽出した 40 歳代から 70 歳代の健常者約 2,300 名について血液検査、検尿、アルコール摂取量を含む生活・病歴調査などのメディカルチェックを実施し、*ALDH2* 遺伝子多型との相関を調べた。その結果、*ALDH2**2 アレルを一つでも保有する女性は、アルコール摂取の影響を除外した場合でも血清中の過酸化脂質

(LPO) 量増加が有意に認められた。この結果は、*ALDH2* 活性の低下がアルコール摂取とは無関係に酸化ストレスを増大させ、*ALDH2**2 アレルが加齢に伴う多くの疾患で危険因子となりうる可能性を示している (Ohsawa, et al, 2003a)。男性では有意差がなかったが、これは男性の場合はアルコール摂取による LPO 蓄積量への影響が強すぎる為であると予想される。では、AD では *ALDH2* 遺伝子多型がどのように影響するのかが問題となる。

4. *ALDH2**2 によるアルツハイマー病発症促進の分子機構

ここまで、*ALDH2**2 アレルの保有は、酸化ストレスを増大させて AD の危険因子となること疫学調査により明らかとなったことを述べてきた。酸化ストレスの増大はアルコール代謝とは無関係に生じることから、*ALDH2* はアセトアルデヒド以外の基質を代謝することで酸化ストレスを抑制しているはずである。また *ALDH2* はミトコンドリアにあることから、ミトコンドリアで生じるアルデヒド類を代謝しているはずである。では、そのアルデヒド類は何であろうか？

ミトコンドリア呼吸鎖から漏れた電子は酸素をスーパーオキシド・ラディカルとする。ここから、ヒドロキシラジカルなどの毒性の高い ROS が派生し、これがカルディオリピンなどの不飽和脂肪酸を攻撃することで LPO が生じる。この LPO からは、酸化ストレスのマーカーとなるマロンジアルデヒドや毒性の強い 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4-HNE) などのアルデヒド類が定常的に生じる。特に 4-HNE はリジン、ヒスチジン、セリンおよびシステイン残基に容易に結合して蛋白の変性を引き起こす (Uchida & Stadtman, 1992)。実際、4-HNE は Na^+ , K^+ -ATPase の活性を低下させ (Siems, et al, 1996)、*in vitro* において神経細胞死を促進することも示されている (Kruman & Mattson,

1999). さらにADやパーキンソン病などの神経変性疾患において4-HNEの蓄積が報告されている(Yoritaka, et al, 1996; Sayre, et al, 1997). 一方, 精製したALDH2は4-HNEを基質として酸化することができ, 細胞に4-HNEを添加するとアルデヒド脱水素酵素によって酸化されることにより生じる4-hydroxy-2-nonenic acid (4-HNA)が検出された(Hartley, et al, 1995).

そこで, 筆者らは, ミトコンドリア酸化ストレスによって生じる4-HNEの除去にミトコンドリア酵素であるALDH2が関与しており, その活性が欠損すると酸化ストレスによる4-HNEの蓄積によって神経細胞死が促進されるはずであるという仮説を立てた. これを検証する為に, マウス・ラット型 *ALDH2*2* 遺伝子を作製し, これをラットPC12細胞に導入した. その結果, *ALDH2*2* 遺伝子を導入した細胞ではALDH2活性が抑制され, 4-HNEによって容易に細胞死が誘導された(図3). また, ミトコンドリア呼吸鎖の複合体III阻害剤であるアンチマイシンAによってROSを生じさせた場合もALDH2活性抑制細胞の細胞死が促進された. この時, ALDH2活性抑制細胞では4-HNEが高度に蓄積していた(図4). 以上の結果は上記の仮説を証明するものであり, ミトコンドリア酸化ストレス除去機構におけるALDH2の役割が細胞レベルで明らかとなった

(Ohsawa, et al, 2003b).

5. ALDH2 活性抑制トランスジェニック・マウスにおける中枢神経系の加齢に伴う変性

個体レベルで酸化ストレス防御における特定遺伝子の関与について解析するには, 遺伝子変異, ノックアウトあるいは遺伝子導入などのモデル動物育種が最良の方法の一つである. 実際にMnスーパーオキシドジスムターゼ(Mn-SOD)欠損マウスでは酸化ストレスが蓄積し, ミトコンドリアの機能不全とそれに続く細胞死が観察される(Melov, et al, 1998). この結果は, 個体レベルでもMn-SODが酸化ストレス除去機構において最も重要な機能を果たしている酵素の一つであることを示しているが, このマウスは生後1週間程度で死んでしまい, 加齢に伴う変化を解析することは不可能である. 最近, ミトコンドリアのターゲット配列を付加したカタラーゼ遺伝子を導入したマウスでは寿命が延びることが報告された(Schriner, et al, 2005). この結果は, 老化における酸化ストレス制御の重要性を明確に示している.

ここでALDH2について考察してみよう. 前述のようにALDH2はアルデヒド脱水素酵素の大きなファミリーに属する. また, 細胞でALDH2により除去される4-HNEなどのアル

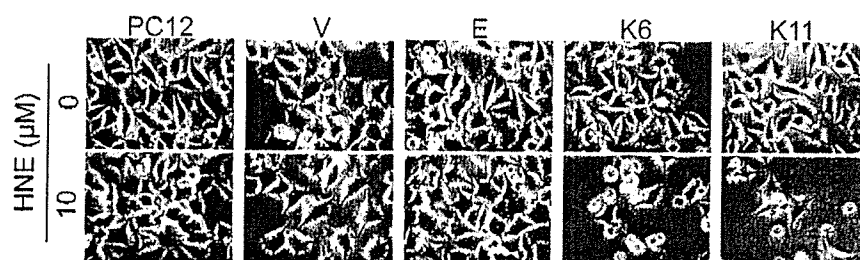


図3. 4-HNEに対して脆弱となった *ALDH2*2* 遺伝子導入PC12細胞
PC12細胞に *ALDH2*2* 遺伝子を導入してドミナント・ネガティブにALDH2活性を抑制した株(K6, K11)では, ALDH2活性を保持する親株(PC12), ベクター導入株(V), *ALDH2*1* 遺伝子導入株(E)では死なない濃度の4-HNEでも, 顕著な細胞死が見られた.

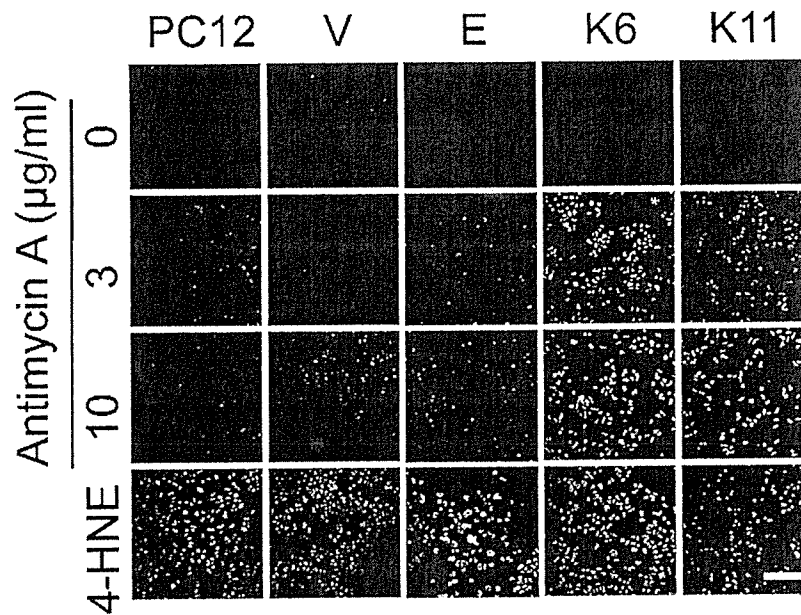


図4. ALDH2 活性の抑制による 4-HNE の蓄積促進
呼吸鎖阻害剤アンチマイシン A を添加して ROS を発生させ、24 時間後の細胞内 4-HNE をその特異的抗体で検出した。ALDH2 活性を抑制した株では、顕著な 4-HNE の蓄積が認められる。細胞株については、図 3 参照。

デヒド類に対しては、ALDH2 に加えてグルタチオンなどの複数の解毒システムが細胞に存在する。こうした遺伝子の場合、他の酵素などを代用することにより、ノックアウトしても大きな変化は見られない可能性が高い。事実、ALDH2 ノックアウト・マウスではメトキシアセトアルデヒドの代謝低下は示されているが、発生過程や身体機能についての異常は見られない (Kitagawa, et al, 2000)。一方、人においては *ALDH2*2* アレルを持つ者は AD の発症危険性が高いなど、ALDH2*2 による ALDH2 活性の抑制は、酸化ストレスの亢進が一因と考えられる種々の疾患の原因となる。そこで、モデル動物においても *ALDH2*2* 遺伝子を導入し、ドミナント・ネガティブに ALDH2 活性を抑制することで、より人に近い状態のモデル動物が育種できるものと期待された。

まず、PC12 細胞で用いたものと同じマウス型 *ALDH2*2* 遺伝子を汎用プロモーターであ

る EF プロモーター下に挿入し、これをマウス C57BL/6 に導入することでトランスジェニック・マウスを作製した。作製したマウスは DAL (Dominant negative of *ALDH2*) マウスと命名した。このマウスはホモで維持しても発生過程での異常は認められず、雄についてのみ生後 3ヶ月齢以降に全身で白髪が見られ、後肢の筋力低下が認められた (図 5)。雌では 24ヶ月齢まで観察を続けたが、C57BL/6 と比較して身体所見に特に異常は認められなかった。そこで、PC12 細胞と同様に 4-HNE に対する脆弱性が中枢の神経細胞でも認められるか検討した。胎生 16 日のマウス胎児から大脳皮質を取り出し初代培養して、これに 4-HNE を添加したところ DAL マウスでは神経細胞死が促進され (図 6)、脳における酸化ストレス亢進の可能性を示唆された。

それでは、DAL マウスの脳で異常が認められるであろうか？ 特に C57BL/6 との差が認め

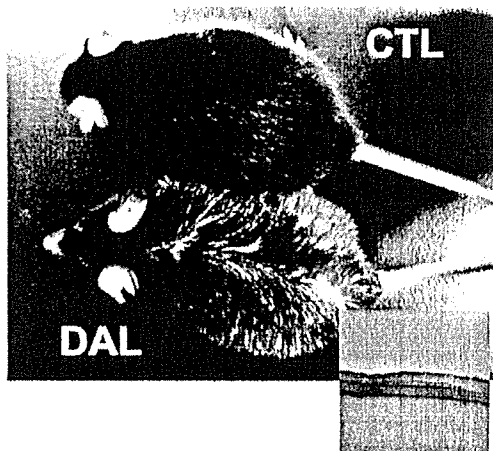


図5. DAL マウス
6ヶ月齢のDAL マウス雄, 体毛に白髪が見られ, 色素が抜けている(挿入写真). CTL は同齢のC57BL/6 雄.

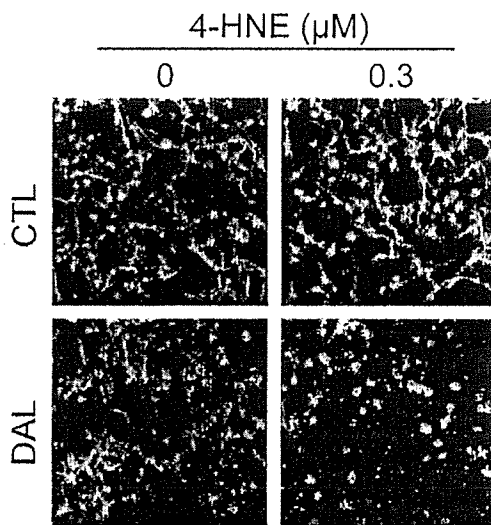


図6. 4-HNE に対して脆弱となったDAL マウスの大脳皮質神経細胞.
脳でALDH2*2が発現しているDAL マウス胎児大脳皮質から初代培養神経細胞を調製し, これに4-HNE を添加して24時間後の細胞を固定, 神経細胞特異的抗体である抗TUJ-1抗体により生存神経細胞を染色した. コントロール(CTL)のC57BL/6より調製した神経細胞に比べ, DAL マウス神経細胞では低濃度の4-HNEで細胞死が見られる.

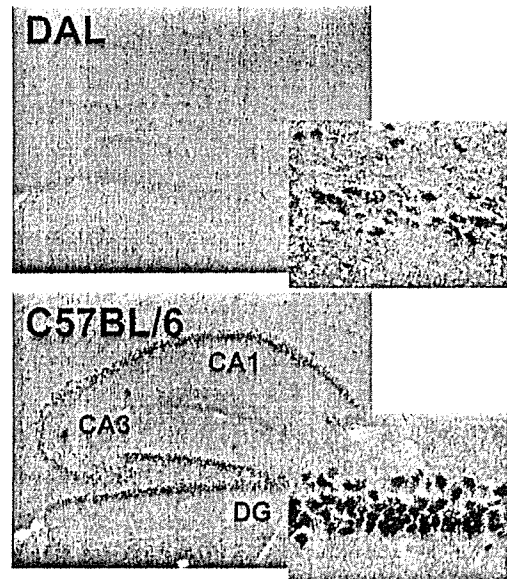


図7. DAL マウスにおける海馬の萎縮と錐体細胞の変性
DAL マウス(雌)では, 18ヶ月齢で顕著な海馬の萎縮と錐体細胞の変性が認められる. HE染色, 挿入図はCA1領域を拡大したもの.

られない雌について解析を行った. まず, 6ヶ月齢のマウスについて脳の剖検を試みたが, C57BL/6の脳と違いはなかった. しかし, 18ヶ月齢のDAL マウスでは海馬の萎縮とそれに伴う錐体細胞の脱落やグリア細胞の活性化といった神経変性の所見が認められた(図7). こうした所見は12ヶ月齢で散見されるようになり, 加齢と共に増加する. しかし, 運動機能や感覚機能についてはDAL マウスとC57BL/6との間に顕著な差はなかった. そこで, 海馬が関与する空間認知能力の試験として多用されている水迷路学習の課題を試みた. その結果の一部を図8に示す. DAL マウス6ヶ月齢では, 学習能力の低下は認められないが, 18ヶ月齢では顕著な低下が見られた. こうした脳の変性と学習能力の低下は, 初代培養神経細胞の場合と同様に酸化ストレスに対する抵抗性の低下によるものと考えられる. 現在, 加齢に伴う4-HNEなどの酸

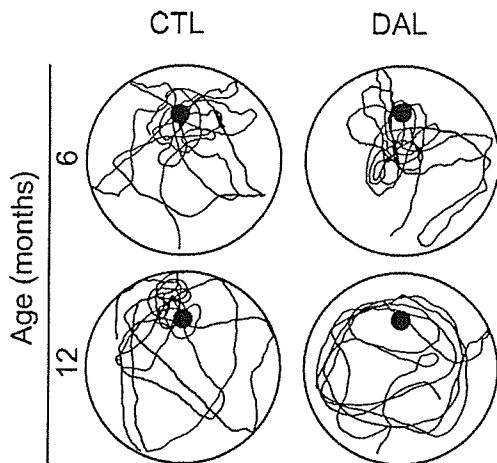


図8. 加齢に伴うDALマウスの学習能力低下。5日間の水迷路学習後にプラットフォームを除去し、60秒間のプローブテストを実施したときの泳路を示す。DALマウス(雌)は6ヶ月齢ではプラットフォームがあった位置(黒丸)を記憶してその周囲を遊泳したが、12ヶ月齢ではプラットフォームの位置に関係なくプール内を泳ぎ廻った。コントロール(CTL)は、C57BL/6雌。

化ストレス・マーカーの変化について解析中である。実際、筋特異的にALDH2*2を発現させた系統のDALマウスでは、筋萎縮の所見とそれに伴うミトコンドリア異常及び4-HNEの蓄積が認められている(Ohsawa, et al, 投稿準備中)。

6. ALDH2によって代謝される4-HNEとアルツハイマー病

今までの結果から、ALDH2*2アレルがアルツハイマー病の危険因子となるのは、加齢に伴う酸化ストレスの増加で脳に4-HNEなどの毒性の高いアルデヒド類が蓄積するが、これを除去する酵素の一つであるALDH2の活性が抑制されることでADの発症を促進しているためである、と仮説を立てている(図9参照)。ここで、二つの疑問が生じる。第一にADの発症以前に4-HNEなどが蓄積するのであろうか？

最近、軽度認知機能障害(MCI)および初期AD患者の海馬や中側頭回において、健常者に比して顕著な4-HNEの増加が報告された(Williams, et al, 2005)。これは、LPOの解析を脳髄液で行った結果(Pratico, et al, 2002)とも一致し、4-HNEに代表される酸化ストレスの蓄積がAD発症以前に起こっていると考えられる。第二に4-HNEなどの蓄積はADに特徴的な病変を引き起こすであろうか？4-HNEは神経細胞死を引き起こすだけでなく、 Na^+ , K^+ ATPase活性を低下させるなどの機構によりシナプスの機能低下をもたらす(Pedersen, et al, 1999)、微小管形成と神経突起進展を強く阻害する(Neely, et al, 1999)。さらにADの病理学的組織像に特徴的な神経原繊維変化(NFT)と酸化ストレスとの関わりについては多くの報告がなされている(Zarkovic, et al, 2003)。特に4-HNEに関しては、リン酸化タウを修飾することで構造変化を引き起こし、タウをNFTに存在する構造とすることが報告されており(Takeda, et al, 2000; Liu, et al, 2005)、NFTの形成に4-HNEが重要な役割を担っているものと考えられている。一方、老人斑については、 β アミロイド($\text{A}\beta$)による酸化ストレスの亢進に関する報告は多数あるが、4-HNEと $\text{A}\beta$ 産生機序との関わりについてはほとんど報告が無かった。しかし、最近になって4-HNEによるストレス応答経路の活性化でBACE1の発現量が上昇することが報告され、 $\text{A}\beta$ 産生量を増加させている可能性が指摘されている(Tamagno, et al, 2005)。また、 $\text{A}\beta$ 沈着モデルのトランスジェニック・マウスでは、 $\text{A}\beta$ の蓄積前にLPOの蓄積が亢進されると報告されている(Pratico, et al, 2001)。

我々の疫学調査から、ALDH2*2アレルとAPOE $\epsilon 4$ アレルとの間で相乗的にADの発症リスクが増大していた。このAPOEと4-HNEとの関連については、AD患者脳を抗4-HNE抗体で免疫染色したところ錐体細胞における細胞質での陽性像がAPOE $\epsilon 4$ アレルをもつ者

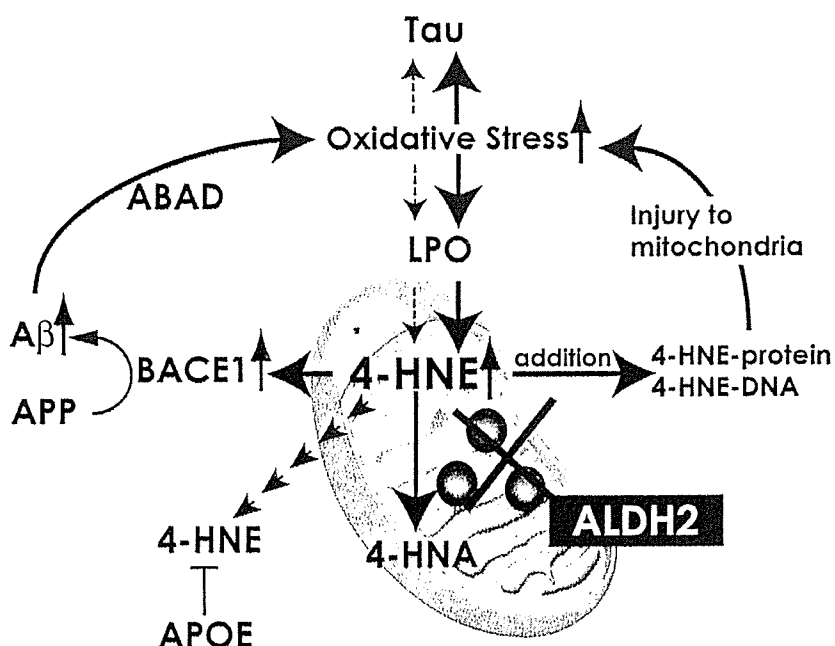


図9. ALDH2 活性の抑制による 4-HNE の蓄積とその影響についてのモデル
 ミトコンドリアにおいて、ALDH2 活性の低下は酸化ストレスによって生じる 4-HNE 蓄積を促進し、これが蛋白や DNA に結合することでミトコンドリア障害を引き起こす。その障害により酸化ストレスは亢進され細胞死に至る。このプロセスが加齢により加速されるため、ALDH2 活性低下は AD など神経変性疾患のリスクとなる。4-HNE を含む酸化ストレスはタウのリン酸化と構造変化をもたらし NFT 形成を促進する。また、4-HNE は BACE1 の発現を上昇させて Aβ の蓄積を促進する。さらに Aβ は ABAD に結合してミトコンドリアを傷害する。一方、APOE は 4-HNE の除去に働く。

にだけ見られたことが報告されている (Montine, et al, 1997). さらに APOE と 4-HNE との結合は $\epsilon 2 > \epsilon 3 > \epsilon 4$ の順に強く、APOE の 4-HNE に対する細胞死抑制効果と一致することが報告されている (Pedersen, et al, 2000). 以上の報告は、生体内で APOE がフリーの 4-HNE を除去する役割を担っており、除去能力の低い APOE である APOE $\epsilon 4$ の保有は神経細胞での 4-HNE 蓄積と酸化ストレスの増大を招くものと考えられる。この時、ALDH2 活性が低下していると 4-HNE の蓄積はますます増大し、その結果として AD 発症の危険性が高まるのであろう。

7. 多様な 4-HNE の除去機構

4-HNE などの毒性の高いアルデヒド類は脂質の過酸化によって定常的に生じることから、その除去機構には ALDH2 などによる酸化、アルドース還元酵素などによる還元 (Rittner, et al, 1999), さらにグルタチオンとの結合 (White and Rees, 1984) などの多様な分子機構が含まれている。最近、我々は ADH の多型が脳梗塞の危険因子であることを見出した (Suzuki, et al, 2004). 肝細胞を用いた研究では ADH も 4-HNE の還元に関与している可能性が報告されており (Hartley, et al, 1995), 神経系での研究進展が必要である。また、複数のアルデヒド脱

水素酵素が4-HNEを酸化していると考えられるが、ALDH2と同様にミトコンドリアに存在するALDH5Aが中枢神経系において4-HNEの解毒に重要な役割を果たしていることが報告されており興味深い (Murphy, et al, 2003).

8. おわりに

DALマウスは成長期を過ぎてから、加齢に伴い徐々に神経変性を生じる。このマウスを解析することで、ADに特徴的な病変と酸化ストレスとの関連を個体レベルで明らかにすることができると期待している。また、このマウスで生じる病変を抑制する適切な方法を開発できれば、ADなどにたいする予防・治療法開発の足がかりとなるだろう。

文 献

1. Amamoto K, Okamura T, Tamaki S, Kita Y, Tsujita Y, Kadowaki T, Nakamura Y, Ueshima H (2002) Epidemiologic study of the association of low-Km mitochondrial acetaldehyde dehydrogenase genotypes with blood pressure level and the prevalence of hypertension in a general population. *Hypertens Res* 25: 857-864.
2. Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, Chen LZ, Fang B, Lisker R, et al. (1992) Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum Genet* 88: 344-346.
3. Hartley DP, Ruth JA, Petersen DR (1995) The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase. *Arch Biochem Biophys* 316: 197-205.
4. Kamino K, Nagasaka K, Imagawa M, Yamamoto H, Yoneda H, Ueki A, Kitamura S, Namekata K, Miki T, Ohta S (2000) Deficiency in mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases the risk for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 192-196.
5. Kim JM, Stewart R, Shin IS, Jung JS, Yoon JS (2004) Assessment of association between mitochondrial aldehyde dehydrogenase polymorphism and Alzheimer's disease in an older Korean population. *Neurobiol Aging* 25: 295-301.
6. Kitagawa K, Kawamoto T, Kunugita N, Tsukiyama T, Okamoto K, Yoshida A, Nakayama K, Nakayama K (2000) Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. *FEBS Lett* 476: 306-311.
7. Kruman II, Mattson MP (1999) Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem* 72: 529-540.
8. Larson HN, Weiner H, Hurley TD (2005) Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase "Asian variant". *J Biol Chem* 280: 30550-30556.
9. Liu Q, Smith MA, Avila J, DeBernardis J, Kansal M, Takeda A, Zhu X, Nunomura A, Honda K, Moreira PI, Oliveira CR, Santos MS, Shimohama S, Aliev G, de la Torre J, Ghanbari HA, Siedlak SL, Harris PL, Sayre LM, Perry G (2005) Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radic Biol Med* 38: 746-754.
10. Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, Crapo JD, Wallace DC (1998) A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 18: 159-163.
11. Montine KS, Olson SJ, Amarnath V, Whetsell WO, Jr, Graham DG, Montine TJ (1997) Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in Alzheimer's disease is associated with inheritance of APOE4. *Am J Pathol* 150: 437-443.
12. Murphy TC, Amarnath V, Gibson KM, Picklo MJ, Sr (2003) Oxidation of 4-hydroxy-2-nonenal by succinic semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A). *J Neurochem* 86: 298-305.
13. Neely MD, Sidell KR, Graham DG, Montine TJ (1999) The lipid peroxidation product 4-hydroxy-nonenal inhibits neurite outgrowth, disrupts neuronal microtubules, and modifies cellular tubulin. *J Neurochem* 72: 2323-2333.
14. Ohsawa I, Kamino K, Nagasaka K, Ando F, Niino N, Shimokata H, Ohta S (2003a) Genetic deficiency of a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases serum lipid peroxides in community-dwelling females. *J Hum Genet* 48: 404-409.
15. Ohsawa I, Nishimaki K, Yasuda C, Kamino K, Ohta S (2003b) Deficiency in a mitochondrial

- aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells. *J Neurochem* 84: 1110-1117.
16. Pedersen WA, Cashman NR, Mattson MP (1999) The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells. *Exp Neurol* 155: 1-10.
 17. Pedersen WA, Chan SL, Mattson MP (2000) A mechanism for the neuroprotective effect of apolipoprotein E: isoform-specific modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem* 74: 1426-1433.
 18. Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 21: 4183-4187.
 19. Pratico D, Clark CM, Liu F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ (2002) Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59: 972-976.
 20. Rittner HL, Hafner V, Klimiuk PA, Szweda LI, Goronzy JJ, Weyand CM (1999) Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis. *J Clin Invest* 103: 1007-1013.
 21. Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA (1997) 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68: 2092-2097.
 22. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS (2005) Extension of murine life span by over-expression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308: 1909-1911.
 23. Shimokata H, Ando F, Niino N (2000) A new comprehensive study on aging—the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA). *J Epidemiol* 10: S1-9.
 24. Siems WG, Hapner SJ, van Kuijk FJ (1996) 4-hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. *Free Radic Biol Med* 20: 215-223.
 25. Suzuki Y, Fujisawa M, Ando F, Niino N, Oh-sawa I, Shimokata H, Ohta S (2004) Alcohol dehydrogenase 2 variant is associated with cerebral infarction and lacunae. *Neurology* 63: 1711-1713.
 26. Suzuki Y, Muramatsu T, Taniyama M, Atsumi Y, Suematsu M, Kawaguchi R, Higuchi S, Asahina T, Murata C, Handa M, Matsuoka K (1996) Mitochondrial aldehyde dehydrogenase in diabetes associated with mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation at position 3243. *Diabetes Care* 19: 1423-1425.
 27. Takagi S, Baba S, Iwai N, Fukuda M, Katsuya T, Higaki J, Mannami T, Ogata J, Goto Y, Ogihara T (2001) The aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor for hypertension in Japanese but does not alter the sensitivity to pressor effects of alcohol: the Suita study. *Hypertens Res* 24: 365-370.
 28. Takeda A, Smith MA, Avila J, Nunomura A, Siedlak SL, Zhu X, Perry G, Sayre LM (2000) In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of tau induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification. *J Neurochem* 75: 1234-1241.
 29. Takeshita T, Morimoto K, Mao X, Hashimoto T, Furuyama J (1994) Characterization of the three genotypes of low Km aldehyde dehydrogenase in a Japanese population. *Hum Genet* 94: 217-223.
 30. Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, Santoro G, Davit A, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M (2005) Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J Neurochem* 92: 628-636.
 31. Uchida K, Stadtman ER (1992) Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4544-4548.
 32. Vasiliou V, Pappa A (2000) Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology* 61: 192-198.
 33. White JS, Rees KR (1984) The mechanism of action of 4-hydroxynonenal in cell injury. *Chem Biol Interact* 52: 233-241.
 34. Williams TI, Lynn BC, Markesbery WR, Lovell MA (2005) Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* in press.
 35. Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Yokoyama T, Okuyama K, Takahashi H, Hasegawa Y, Higuchi S, Maruyama K, Shirakura K, Ishii H, (1998) Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis* 19: 1383-1387.
 36. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M,

- Stadtman ER, Mizuno Y (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2696-2701.
37. Yoshida A, Huang IY, Ikawa M (1984) Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 258-261.
38. Zarkovic K (2003) 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* 24: 293-303.
-

特集 アルツハイマー病研究の最前線—基礎と臨床

アルツハイマー病におけるミトコンドリア機能低下、
酸化ストレスの役割*

太田成男**

ミトコンドリアはエネルギー産生の中心を担うオルガネラであり、電子伝達系より漏れ出した電子を酸素が吸収することにより、活性酸素を発生させる。筆者らは、大規模患者対照関連解析研究によって、ミトコンドリアのクエン酸回路の DLST (dihydropyridin succinyltransferase) 遺伝子と、ミトコンドリア ALDH2 (アルデヒド脱水素酵素 2) の遺伝子のそれぞれの多型が、アルツハイマー病の危険因子となることを見出した。DLST 遺伝子には 2 つの遺伝子産物があり、新しく発見した DLST 遺伝子産物 MIRT2 は、シトクロム c 酸化酵素の分子集合に関与することを明らかにした。ALDH2 は酸化ストレスの防御機構として働いていることを明らかにし、ALDH2 酵素活性低下がアルツハイマー病発症の原因となりうることを示した。最近になって、アミロイドβペプチドが神経細胞のミトコンドリア内にも存在することがわかり、アルツハイマー病の特異性とミトコンドリアの役割が関連づけて議論できるようになった。

キーワード：シトクロム c 酸化酵素, DLST, βアミロイド, 活性酸素

はじめに—ミトコンドリアは多機能性オルガネラ

ミトコンドリアはエネルギー代謝を司るオルガネラである。多段階のステップを通じて糖、脂肪酸、アミノ酸などの基質を酸化し、NAD⁺とFADを還元する。その還元エネルギーをエネルギー源として、一連の電子伝達系によって酸化還元力反応を進める。電子伝達系によって生じたミトコンドリア内膜間の電気化学的ポテンシャルが、ATP合成のエネルギーとなる。神経細胞では、ATPはNa-K-ATPaseによってNa⁺を細胞外へくみ出す際に大量に消費される。電子伝達系から漏れ出した電子が酸素に吸収されることによって、活性酸素の一種であるスーパーオキシド(super oxide)が生じる。ミトコンドリアは最大の活性酸素(reactive oxygen species: ROS)放出源である(Ohta, 2003)。

ミトコンドリアはエネルギー代謝専門のオルガネラと、長らく認識されてきたが、アポトーシスの開始シグナル、制御因子、実行因子がミトコンドリアに貯えられており、アポトーシスの際にミトコンドリアから速やかに放出される。また、ミトコンドリアはカルシウムの保存庫であり、カルシウムの濃度調節をして細胞死を調節している。エネルギー産生の低下は細胞内のホメオスタシス恒常性を破壊し、ネクローシスによる細胞死を誘発する。ミトコンドリアは多彩な方法で細胞の生と死を制御している。エネルギー産生低下、ROSによる酸化ストレス、アポトーシスによる細胞死、カルシウムによる細胞毒性と、ミトコンドリアは様々な面で神経細胞死と密接に関連している(Ohta, 2003)。

ここでは、ミトコンドリアが一般的に神経細胞死に

2005年4月4日受稿

* Contribution of dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

** 日本医科大学大学院医学研究科加齢科学系専攻細胞生物学分野(〒211-8533 神奈川県川崎市中原区小杉町1-396) Shigeo OHTA: Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Development and Aging Sciences, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, 1-396 Kosugi-cho, Nakahara-ku, Kawasaki, Kanagawa 211-8533, Japan.

0001-8724/05/¥500/論文/JCLS

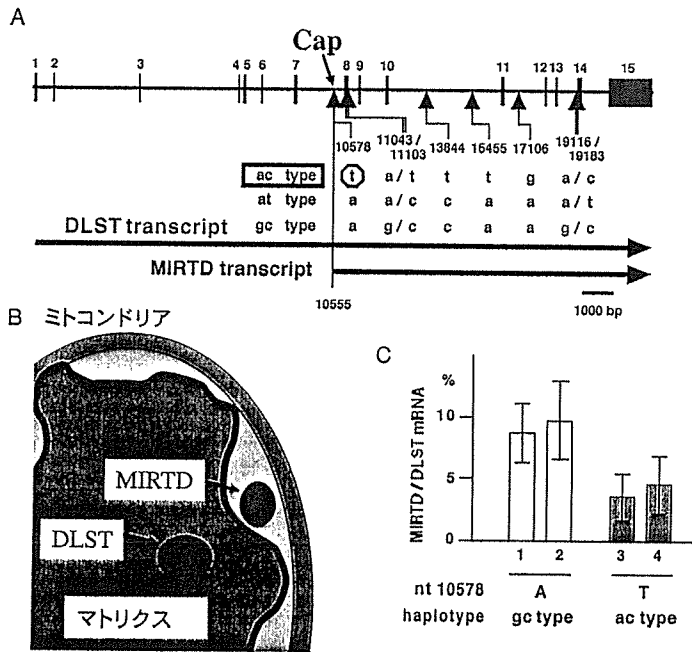


図1 DLST遺伝子は二重機能性遺伝子

A: DLST (クエン酸回路の律速酵素) 遺伝子は15エクソンから成り立つが、イントロン7から転写開始する遺伝子産物MIRTIDがある。B: 同じ読み枠で蛋白質が合成され、全長のDLSTはミトコンドリアのマトリクスに存在し、C末端側の半分程度の長さのMIRTIDは、ミトコンドリアの内膜と外膜の膜間腔に存在する。C: MIRTIDの転写頻度は、DLST遺伝子多型に依存する。アルツハイマー病の危険因子となるハプロタイプacでは、MIRTIDの転写頻度が低い。

関与するというのではなく、アルツハイマー病の特異性に注目して、ミトコンドリアの関与について述べる。

1. エネルギー代謝低下とシトクロムc酸化酵素の活性低下

アルツハイマー病患者脳ではグルコースの消費が少なく、エネルギー代謝が低下していることは以前から知られていた(Swerdlow & Kish, 2002)。しかしながら、エネルギー代謝の低下はアルツハイマー病の原因というより、むしろ死の途中の結果として認識してきた人が多いようである。ミトコンドリア機能低下という点では、特にシトクロムc酸化酵素(COX)活性の低下が以前から指摘されていた(Maurer et al, 2000; Cottrell et al, 2001)。COXは、電子伝達系の最終段階の酵素で、酸素分子を水へと還元する酵素である。核遺伝子産物の10種類のサブユニット、ミトコンドリア遺伝子産物の3種類のサブユニットの集合体である。アルツハイマー病患者では、脳ミトコンドリアだけでなく、血小板のミトコンドリアでもCOX活性が低下していることから、単なる二次的結果としてのCOX低下は考えられない(Parker et al, 1994; Mancuso et al, 2003; Cardoso et al, 2004)。また、COXの阻害剤であるアジ化化合物によって、アルツハイマー病様の症状を現すことができる(Szabados et al, 2004)。

1. DLST遺伝子とシトクロム酸化酵素の集合欠損

筆者らは、ミトコンドリアのクエン酸回路の α -ケトグルタル酸脱水素酵素の成分酵素である、ジヒドロリポアミドサクニル転移酵素(dihydrolipoamide succinyltransferase: DLST)に長らく注目してきた。DLST遺伝子に注目したきっかけは、DLST遺伝子が家族性アルツハイマー病の原因遺伝子と同一領域に存在していることを明らかにしたからである(Nakano et al, 1993)。残念ながら家族性アルツハイマー病の原因遺伝子はDLSTではなく、プレスニリン-1であった。しかし、詳細に孤発性アルツハイマー病患者のDLSTのハプロタイプ頻度と対照人のハプロタイプ頻度を注意深く比較すると、DLST遺伝子のハプロタイプacは、孤発性アルツハイマー病の危険因子であることが示唆された(Nakano et al, 1997)。しかし、そのハプロタイプを決める2つの遺伝子の単一塩基多型(SNP)は、イントロン13とエクソン14のコドンの第3文字に存在しており、いずれもアミノ酸変化を伴わないSNPであった。このDLSTのSNPとアルツハイマー病の関連は、海外でも報告されたが(Sheu et al, 1998; Sheu et al, 1999)、否定的な結果も同時に報告されている(Kunugi et al, 1998)。おそらく、それほど強くない危険因子なのであろう。

筆者らは、以下に述べるように、DLST遺伝子を解析することによって、DLST遺伝子産物のひとつはCOX分子集合を制御することによって、アルツハイ

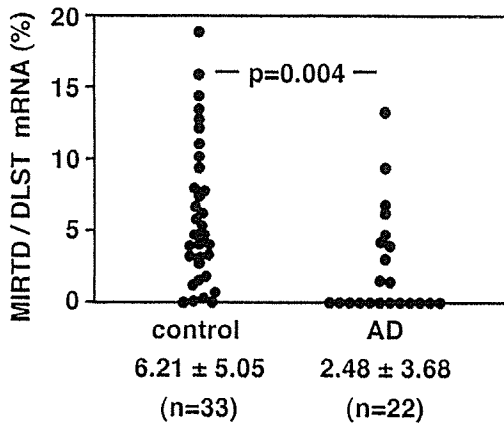


図2 アルツハイマー病患者脳および高齢者脳の剖検脳による MIRT D の発現
MIRT D の mRNA 量と DLST mRNA の比率を求めた。MIRT D の発現量は個人差が大きい。アルツハイマー病では対照に比べて有意に少なく、半数の患者脳では MIRT D mRNA は検出できなかった。

マー病に関与していることを示唆した (Kanamori et al, 2003)。

まず、DLST 遺伝子には全長 mRNA だけでなく、イントロン7から転写を開始する mRNA が存在する (図1A)。この mRNA からできた遺伝子産物を MIRT D (mitochondrial respiration generator of truncated DLST) と名づけた。MIRT D は、ミトコンドリアの膜間腔に存在する (図1B)。さらに、アルツハイマー病の危険因子であるハプロタイプ ac と連鎖不平衡にあるイントロン7の SNP が、MIRT D の転写効率を調節していることもわかった (図1C)。さらに、MIRT D はアルツハイマー病患者脳では、癌で亡くなった同年代の対照に比べ有意に減少しており、とりわけ22人中のアルツハイマー病患者脳の11人からは、MIRT D の mRNA が検出できなかった (図2)。

MIRT D の機能を明らかにするために、神経芽培養細胞の MIRT D mRNA を選択的に切断し、MIRT D を減少させると、呼吸鎖複合体 I と IV (COX) のサブユニット量が顕著に減少しており、それは分子集合ができなくなり消失したからであることがわかった (図3)。すなわち、全長の DLST はマトリクスでクエン酸回路の律速酵素として、N 末端側が欠けた MIRT D は膜間腔で呼吸鎖酵素複合体 I と IV (COX) の分子集合に関与することで、いずれもミトコンドリアのエネルギー代謝を担っている。

以上の結果をまとめると、アルツハイマー病患者に多い DLST 遺伝子多型では MIRT D の発現が低下し、

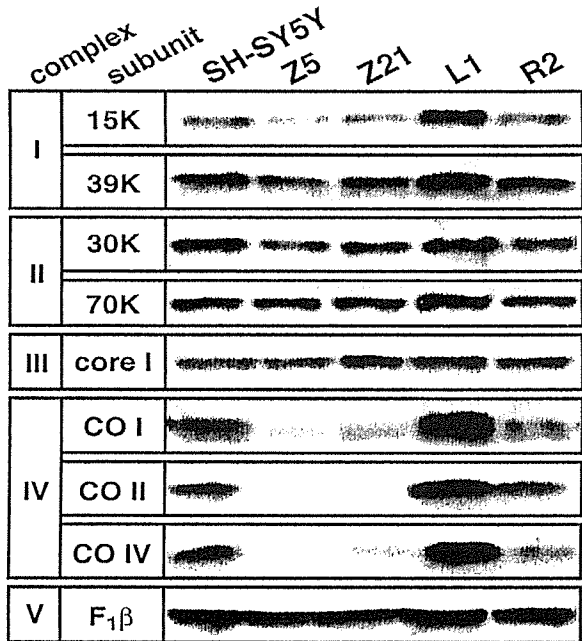


図3 MIRT D 発現低下細胞におけるシトクロム c 酸化酵素と複合体 I の分子集合の欠損

MIRT D の発現を抑制するために、リボザイムの一種である Maxizyme を SH-SY5Y 細胞に導入し、MIRT D の mRNA の 5'側を選択的に切断した。クローン Z5 と Z21 は MIRT D が発現していない細胞。他は対照株である。複合体 I と IV (COX) のサブユニットが特異的に減少していた。複合体 IV (COX) においてはサブユニットの減少は顕著であった。CO I と CO II はミトコンドリア遺伝子産物、CO IV は核遺伝子産物。いずれも合成は正常に行われていることから、分子集合に欠損があると示唆された。

COX の分子集合に影響し、ミトコンドリアの呼吸鎖活性を低下させる。DLST 遺伝子多型を考慮せずとも、アルツハイマー病患者脳では MIRT D の減少は顕著であり、特にアルツハイマー病患者脳の半数では MIRT D の発現がみられない。酸化ストレスなどにより MIRT D mRNA の発現は低下するので、DLST の SNP が MIRT D を調節する唯一の原因というより、多くの内外の環境要因によって MIRT D 量が調節されていると考えたほうがいいだろう。アルツハイマー病患者脳における COX の活性低下は、MIRT D 欠損によって説明できる (Kanamori et al, 2003)。

2. Aβによる COX 活性阻害

COX 活性低下は、ミトコンドリアのエネルギー代謝の律速段階であり、COX 活性低下は細胞全体の ATP 合成を低下させる。したがって、COX 活性の低下だけで細胞死の原因としては十分である。しかし、アルツ

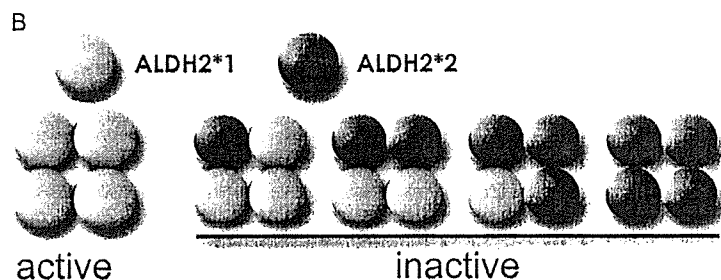
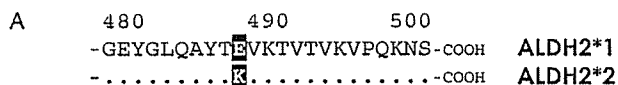


図4 ALDH2 遺伝子多型と酵素活性

A: ALDH2 の C 末端領域のアミノ酸配列。ALDH2*1 が活性型、ALDH2*2 が不活性型。B: 4 量体を形成して酵素活性を示す。不活性型のサブユニットが 1 つでもあると不活性型になるので、dominant-negative に不活化する。ALDH2*1 と ALDH2*2 が 1:1 の場合は酵素活性は 16 分の 1 になる。

ハイマー病の特異性を説明することはできない。最近、アミロイドβペプチド(Aβ)が、COX 活性を阻害することが相次いで報告されている (Caseley et al, 2002; Strazielle et al, 2003; Crouch et al, 2005)。COX はミトコンドリアの内膜に存在する。最近になって、Aβ はミトコンドリアにも存在することが明らかにされた。しかも、Aβ をアミロイド前駆体蛋白 (APP: amyloid precursor protein) から切り出すγ-secretase がミトコンドリアにも存在することが報告され、ミトコンドリア内で Aβ が生成する可能性もありうる (Teng & Tang, 2005)。この Aβ による COX 活性の阻害は、エネルギー代謝を低下させるだけでなく、電子伝達系を停止させることによって、活性酸素を放出させる可能性も同時に存在する。

II. 酸化ストレスとアルツハイマー病

ミトコンドリア内では電子伝達系から漏れ出した電子が酸素と反応して、スーパーオキシドが生成する。このスーパーオキシドはミトコンドリア内の MnSOD (Mn-superoxide dismutase) によって速やかに過酸化水素に変換され、次いでカタラーゼあるいはグルタチオンペルオキシターゼによって水に変換される。ミトコンドリア内で生じたスーパーオキシドはそれほど酸化活性が強いわけではなく、直接 DNA や蛋白質に損傷を与えるほどではない。しかし、このスーパーオキシドを解毒する Mn-SOD 酵素を欠損させると、神経系を中心に重大な影響があることから、スーパーオキシドが重大な神経細胞傷害性を与えていることはまちがいない (Melov et al, 1998)。しかし、この ROS がどのようにして細胞を死に至らしめるかは不明であった。筆者らは、ALDH2 の研究から、ROS とアルツハイマー病との関係を解明する糸口を見出した。

1. ALDH2 遺伝子多型はアルツハイマー病の遺伝的危険因子

ミトコンドリアマトリクスには少なくとも 2 種類のアルデヒド脱水素酵素があり、その 1 つのアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) は、アルコール代謝の中心を担っている。エタノールは通常、アルコール脱水素酵素によってアセトアルデヒドに酸化される。ALDH2 は低濃度のアセトアルデヒドを酢酸に変え、酢酸はアセチル CoA となってエネルギー代謝経路へ導入される。ALDH2 には北アジア人に特有の単一遺伝子多型 (SNP) があり、エクソン 12 の SNP により 487 番目のグルタミン酸がリジンへと変換し、不活型となる (図 4A)。酵素活性型 (487E) を ALDH2*1 と呼び、不活型 (487K) を ALDH2*2 と呼ぶ。ALDH2 では 4 量体が酵素活性を示し、ALDH2*2 遺伝子産物はドミナントネガティブに酵素活性を低下させる (図 4B)。したがって、ALDH2*1 遺伝子産物と ALDH2*2 遺伝子産物が 1:1 でも酵素活性は 16 分の 1 になる。

筆者らは、ALDH2 とアルツハイマー病の関連に注目し、大規模患者対照関連解析を行った (Kamino et al, 2000)。日本国内でも地域によって、ALDH2 遺伝子の SNP の頻度が少しずつ異なる。そのため、対照の非アルツハイマー病健常人とアルツハイマー病患者の地域、性別、年齢を厳密に一致させた。すると、アルツハイマー病患者には ALDH2*2 の SNP 頻度が、男女差なく有意に高かった (Odd 比 1.6, p=0.001)。さらに、ALDH2*2 の頻度が偶然ではないことを確認するために、APOE-ε4 の遺伝子と組み合わせて比較すると、APOE-ε4 と ALDH2 の相乗効果がみられた (図 5)。偽陽性なら相乗効果はみられないはずであり、ALDH2*2 が危険因子であることがより確実になった。さらに、APOE-ε4 と ALDH2*2 の相乗効果によって、発症年齢も有意に速められることが示された。

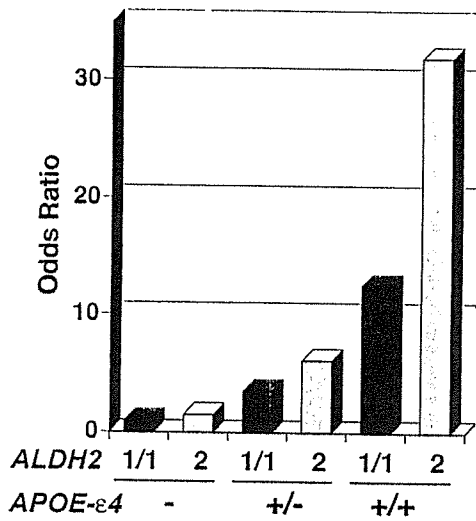


図5 孤発性アルツハイマー病におけるALDH2遺伝子多型とAPOE-ε4の相乗効果
アルツハイマー病447人と、地域、年齢、性別を一致させた対照447人のアルツハイマー病発症頻度を比較した。ALDH2の1/1はALDH2*1のホモ, 2はALDH2*2を持つ人(ホモとヘテロの合計)。APOE-ε4(-)はなし, (+/-)はヘテロ, (+/+)はホモ。ALDH2*2を持ち、APOE-ε4ホモの人はオッズ比にして最大31の発症頻度となる。対応する人は日本人の1%程度。

これらの結果は、病理診断によって確定した患者試料を用いて、筑波大の玉岡らによってALDH2*2がアルツハイマー病の危険因子であること、APOE-ε4との相乗効果があることの再現性が確認された(Tamaoka et al, 2003, 日本痴呆学会)。

2. 4-hydroxy-2-nonenalの役割—ALDH2*2がアルツハイマー病の危険因子となる分子機構

次に、ALDH2*2がアルツハイマー病の発症に関わる原因を突き止めるために、まず、ALDH2*2を持つ人の表現型を明らかにしようとした。一般的な調査では、遺伝子によって起こされる遺伝的要因による表現型なのか、遺伝子に影響される生活習慣によって起こされる表現型なのかを区別することは難しい。ALDH2の遺伝子多型では、遺伝子型と飲酒の関連は非常に相関が強くて、ALDH2*1ホモの人は飲酒量が多い。すなわち、飲酒という生活習慣の違いによって生じた表現型と、直接的な遺伝子により生じた表現型の区別が通常はできない。

長寿医療研究センターの疫学研究部(下方浩史部長)の大規模疫学調査では、飲酒量も含めた生活習慣につ

いての調査も同時に行っている(Shimokata et al, 2000)。地域住民の住民台帳から無作為抽出して対象者を選定しているの、厳密に偏りのない中立的な集団が対象である。2,259人を対象にALDH2遺伝子多型を調べ、飲酒量の効果を補正し、ALDH2*2の表現型の特徴を探った。すると、ALDH2*2を持つ女性群で飲酒量とは無関係に、血中過酸化脂質濃度が有意に高いことが判明した(Ohsawa et al, 2003)。男性の場合、飲酒量とALDH2遺伝子多型の相関があまりに強く、飲酒量を補正しきれなかったので有意差が出なかったのかもしれない。

アルツハイマー病患者脳においても、過酸化脂質の蓄積が報告されている(Montine et al, 2002)。そこで、飲酒の結果ではなくALDH2*2の遺伝子の直接効果によって、酸化ストレスが亢進していることを推定した。ミトコンドリアから発生したスーパーオキシドが、不飽和脂肪酸と反応して過酸化脂質が生成する。過酸化脂質からは自然反応でtrans-4-hydroxy-2-nonenal(4-HNE)が生成される。4-HNEはアルデヒド基を持ち、反応性が高く、蛋白質を修飾して失活させるので、低濃度でも細胞毒性は高く、細胞を死に導く。しかも、アルツハイマー病では4-HNEが蓄積していることが報告されている。そこで、以下の作業仮説を立てた(図6)。(1)ALDH2は4-HNEのアルデヒド基を酸化して解毒する役割がある、(2)ALDH2の酵素活性が低下している人では4-HNEを十分酸化することができないので、4-HNEが相対的に蓄積する、(3)4-HNEの蓄積によりミトコンドリア呼吸鎖酵素活性が阻害され、ROS出現の頻度が高くなる、(4)ROSにより過酸化脂質が生成し、自然反応で4-HNEが生成される。

以上の作業仮説を証明するために、マウス型(ラット型も同じ)ALDH2*2遺伝子を作製し、ラットPC12細胞に導入した。ALDH2*2遺伝子を導入して発現させた細胞では、ALDH2活性が抑制された。そして、ALDH2酵素活性低下細胞では、4-HNEによって容易に細胞が死滅した(図7)。また、アンチマイシンAによってミトコンドリアから活性酸素を放出させると、ALDH2活性欠損株では4-HNEが蓄積した(図8)。以上の結果から、ALDH2は細胞内で4-HNEを酸化し、解毒することが証明された(Ohsawa et al, 2003)。アルツハイマー病患者脳で4-HNEが蓄積する原因はALDH2酵素欠損だけとは限らず、何らかの他の原因によって酸化ストレスの亢進した結果、4-HNEが蓄積すると考えてもよい。現在、ALDH2*2を導入したトランスジェニックマウスを作製し、神経細胞を含めた老化現象が促進されていることを確認している。

図6 trans-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) の形成機構と ALDH2 による酸化
4-HNE は過酸化脂質より生成し、ALDH2 によって酸化される。4-HNE は蛋白質や核酸を修飾し、不活化させるので細胞傷害性が高い。

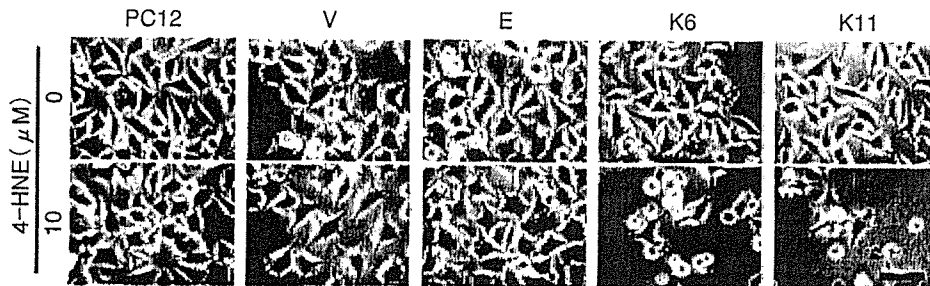
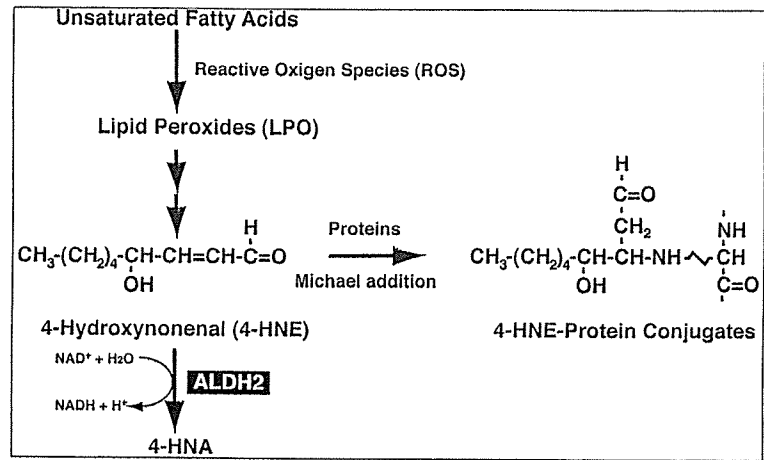


図7 マウス型 ALDH2*2 を導入したラット PC12 の 4-HNE に対する脆弱性
PC12 にマウス型 aldh2*2 遺伝子を導入し、ALDH2 活性を低下させた(クローン K6, K11)。4-HNE を加えると ALDH2 活性を持つクローンではほとんど死なないのに対し、ALDH2 酵素活性のない K6 と K11 は容易に死滅した。

韓国でも ALDH2 遺伝子多型とアルツハイマー病の関連に興味をもたれ、認知能力と ALDH 活性の相関関連はないという結果が報告されている (Kim et al, 2004)。アルツハイマー病 60 人を解析し、統計的有意差が認められなかったとしているが、人数の点から有意差が出ないのは当然であろう。

従来から ALDH2 はアルコール代謝との関連でのみ議論されてきた。しかし、飲酒をしない他の動物でも同じ遺伝子が存在するので、ALDH2 には飲酒とは無関係の本来の機能があるはずである。筆者らの研究結果からは、ALDH2 は酸化ストレスの防御機構のひとつと考えるのが妥当である (Ohta et al, 2004)。

3. ABAD と A β

最近になって、ミトコンドリア内のアルコール脱水素酵素がアルツハイマー病に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。アルツハイマー病において、ミトコンドリアの機能低下はアミロイド β 蛋白 (A β) による神経細胞毒性での顕著な特徴として認められて

いたが、その分子機序については不明であった。アミロイド β 蛋白結合アルコール脱水素酵素 (ABAD) が、A β とミトコンドリア毒性を直接的に結びつける分子であることが示された。AD 患者およびトランスジェニックマウスのミトコンドリアにおいて、A β が ABAD と結合することが明らかにされた (Lustbader et al, 2004)。 NAD^+ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) 存在下で行った ABAD-A β 複合体の結晶構造解析によると、A β と結合した ABAD では結合部位の立体構造が大きく変化しており、 NAD^+ と結合できなくなっていた。ABAD-A β 相互作用を特異的に阻害する ABAD 由来ペプチドが、神経細胞において A β により誘導されるアポトーシスとフリーラジカルの生成を抑制することが示された。A β 産生を高めると考えられる変異型アミロイド前駆蛋白と ABAD を、同時に過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいて、神経細胞における酸化ストレスの増加と記憶障害の発現が見出された。これらの結果より、ミトコンドリアに

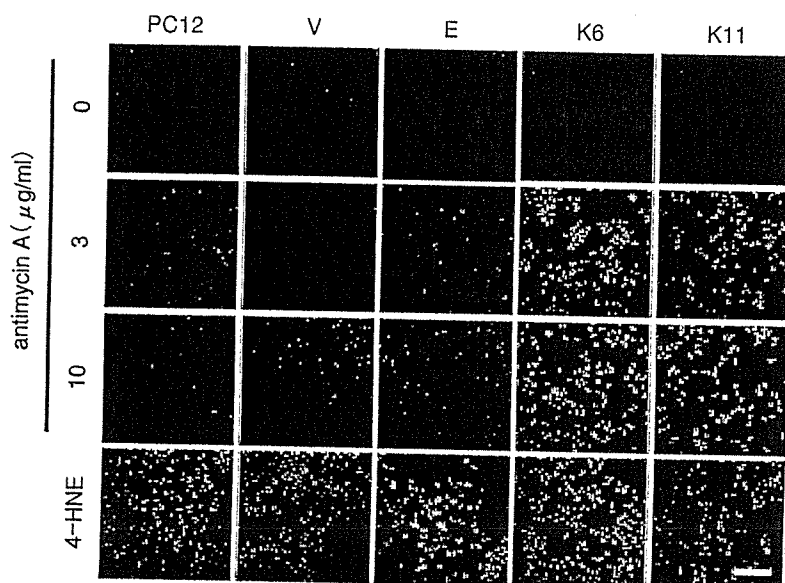


図8 ALDH2活性と4-HNEの蓄積

図7と同じ細胞でアンチマイシンAにより呼吸鎖から活性酸素を放出させた。下段の4-HNEは外から加えたコントロール。4-HNEを特異的抗体で検出した。ミトコンドリアから放出された活性酸素により4-HNEが生成し、ALDH2活性が消失したクローンK6、K11では、4-HNEが蓄積している。

おける ABAD と Aβ との結合とそれに引き続くミトコンドリア機能の破綻が、AD での神経細胞死発現に密接に関わることが示されるとともに、ABAD-Aβ 相互作用が AD の治療標的となりうることが示唆された。

さらに、APP に変異があり高発現しているトランスジェニックマウスに ABAD を発現させると ROS が発現し、ATP が減少し、アポトーシスが誘導された (Takuma et al, 2005)。しかも ROS の出現は COX の活性低下と相関していた。COX の阻害剤で活性を低下させると ROS の出現はさらに顕著になるので、COX の低下と ABAD と Aβ の結合が ROS の出現を促進しているようである。

以前から Aβ の毒性は ROS により増強されることが報告されている (Behl et al, 1994)。最近の報告は以前の報告と矛盾せず、分子機構がより詳細に明らかにされつつある。

III. ミトコンドリア DNA の体細胞変異とアルツハイマー病

ミトコンドリア DNA (mtDNA) は加齢に伴って、酸化ストレスにより体細胞変異が蓄積する。神経細胞は、酸素消費に伴い ROS が発生しやすい組織であり、mtDNA に変異が蓄積しやすい細胞である。同時に、神経細胞自身は増殖しないのに対して、継続的に mtDNA は複製と消失を続ける。そのため、神経細胞の mtDNA の体細胞変異はより蓄積されやすい。通常、体細胞変異では変異 mtDNA と正常 mtDNA が混在す

ることになるが、特定の変異だけが蓄積する場合でないと検出が難しい。

アルツハイマー病患者脳由来の mtDNA を持ち、癌細胞の核を持つ人口細胞を用いた実験では、Aβ の毒性が強くなっており、mtDNA の変異蓄積が検出できない程度でも、変異 mtDNA が Aβ の細胞毒性を助長しているようである (Cardoso et al, 2004)。

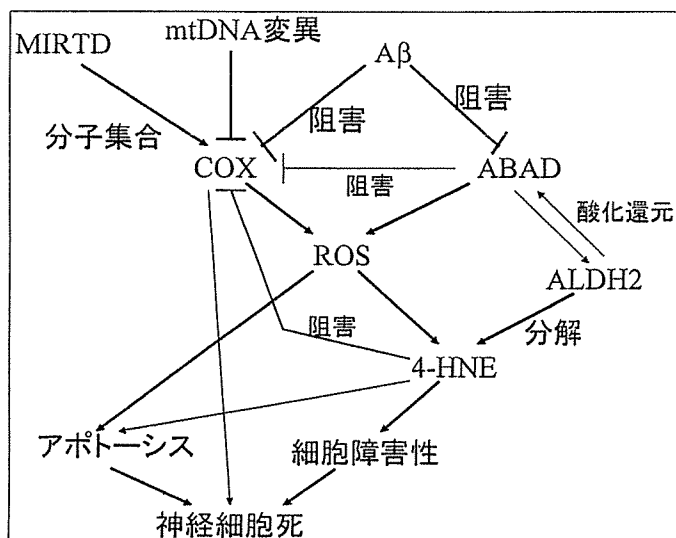
さらに、アルツハイマー病患者脳の mtDNA を調べると、検出できるくらいに変異が蓄積している場所があり、しかもそこは転写制御領域であった。アルツハイマー病患者脳でみられた変異の蓄積によって転写が低下し、COX の活性が低下していた (Coskun et al, 2004)。mtDNA の体細胞変異によって、COX などのミトコンドリア機能が低下するのも、アルツハイマー病の発症の一原因と言ってもいいだろう。

おわりに

ミトコンドリアはエネルギー代謝、アポトーシス、カルシウム調節、活性酸素の発生源であり、細胞死と様々な点で関連している。しかし、アルツハイマー病における神経細胞死とどのように関与するかという分子機構は、未解決の問題であった。アミロイドβがミトコンドリア内で COX 活性を阻害したり、アルコール脱水素酵素と結合して ROS を発生させるという報告は、アルツハイマー病の発症にミトコンドリアが直接的な役割を果たしている証拠であろう。また、筆者らの COX の分子集合に関与する MIRTID が、アルツハイマー病患者脳には少ないという結果も一致した結

図9 ミトコンドリア内における MIRTD, COX, A β , ABAD, 4-HNE, ALDH2 の相互関係

MIRTD が COX の分子集合を司るので MIRTD 減少細胞では COX 活性が低下する。A β は COX の活性を阻害し、ROS を発生させる。mtDNA 変異は COX 活性を低下させ ROS を促進する。一方、A β は ABAD (A β 結合アルコール脱水素酵素) と結合して ABAD の活性を低下させ、ROS を発生させる。ROS は過酸化脂質を経由して毒性の強い 4-HNE を生成する。ALDH2 は 4-HNE を解毒する。



果、ALDH2 酵素活性欠損がアルツハイマー病の危険因子となるのは、ALDH2 がミトコンドリア内で酸化ストレスの防御機構として働いているからである。図9にミトコンドリア内における MIRTDC, COX, A β , ABAD, 4-HNE, ALDH2 の相互関係をまとめた。アルツハイマー病の原因は、最終的にミトコンドリアのエネルギー代謝を低下させ、ROS を生じさせることが本質的な原因かもしれない。今後の研究成果に期待したい。

文 献

- 1) Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D: Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77: 817-827, 1994
- 2) Cardoso SM, Santana I, Swerdlow RH, Oliveira CR: Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances A β toxicity. *J Neurochem* 89: 1417-1426, 2004
- 3) Cardoso SM, Proenca MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR: Cytochrome c oxidase is decreased Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging* 25: 105-110, 2004
- 4) Caseley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA: β -amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activity. *J Neurochem* 80: 91-100, 2002
- 5) Coskun PE, Beal MF, Wallace DC: Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10726-10731, 2004
- 6) Cottrell DA, Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Turnbull DM: Cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurons and choroids epithelial cells are increased in Alzheimer's disease. *Neurology* 57: 260-264, 2001
- 7) Crouch PJ, Blake R, Duce JA, Ciccostoto GD, Li QX, Barnham KJ, Curtain CC, Cherny RA, Cappai R, Dyrks T, Masters CL, Trounce IA: Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42. *J Neurosci* 25: 672-679, 2005
- 8) Kamino K, Nagasaka K, Imagawa M, Yamamoto H, Yoneda H, Ueki A, Kitamura S, Namekata K, Miki T, Ohta S: Deficiency in mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases the risk for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 192-196, 2000
- 9) Kanamori T, Nishimaki K, Asoh S, Ishibashi Y, Takata I, Kuwabara T, Taira K, Yamaguchi H, Sugihara S, Yamazaki T, Ihara Y, Nakano K, Matuda S, Ohta S: Truncated product of the bifunctional DLST gene involved in biogenesis of the respiratory chain. *EMBO J* 22: 2913-2923, 2003
- 10) Kim JM, Stewart R, Shin IS, Jung JS, Yoon JS: Assessment of association between mitochondrial aldehyde dehydrogenase polymorphism and Alzheimer's disease in an older Korean population. *Neurobiol Aging* 25: 295-301, 2004
- 11) Kunugi H, Nanko S, Ueki A, Isse K, Hirasawa H: DLST gene and Alzheimer's disease. *Lancet* 351: 1584, 1998
- 12) Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H: ABAD directly links A β to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304: 448-452, 2004
- 13) Mancuso M, Filosto M, Bosetti F, Ceravolo R, Rocchi A, Tognoni G, Manca ML, Solaini G, Siciliano G, Murri L: Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration

- during exercise in patients with Alzheimer disease. *Exp Neurol* 182 : 421-426, 2003
- 14) Maurer I, Zierz S, Moller H : A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging* 21 : 455-462, 2000
 - 15) Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, Crapo JD, Wallace DC : A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 18 : 159-163, 1998
 - 16) Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD : Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 33 : 620-626, 2002
 - 17) Nakano K, Matuda S, Sakamoto T, Takase C, Nakagawa S, Ohta S, Ariyama T, Inazawa J, Abe T, Miyata T : Human dihydrolipoamide succinyltransferase : cDNA cloning and localization on chromosome 14q24.2-q24.3. *Biochim Biophys Acta* 1216 : 360-368, 1993
 - 18) Nakano K, Ohta S, Nishimaki K, Miki T, Matuda S : Alzheimer's disease and DLST genotype. *Lancet* 350 : 1367-1368, 1997
 - 19) Ohsawa I, Nishimaki K, Yasuda C, Kamino K, Ohta S : Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells. *J Neurochem* 84 : 1110-1117, 2003
 - 20) Ohsawa I, Kamino K, Nagasaka K, Ando F, Niino N, Shimokata H, Ohta S : Genetic deficiency of a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases serum lipid peroxides in community-dwelling females. *J Hum Genet* 48 : 404-409, 2003
 - 21) Ohta S, Ohsawa I, Kamino K, Ando F, Shimokata H : Mitochondrial ALDH2 deficiency as an oxidative stress. *Ann NY Acad Sci* 1011 : 36-44, 2004
 - 22) Ohta S : A multi-functional organelle mitochondrion is involved in cell death, proliferation and disease. *Curr Med Chem* 10 : 2485-2494, 2003
 - 23) Parker WD Jr, Mahr NJ, Filley CM, Parks JK, Hughes D, Young DA, Cullum CM : Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease. *Neurology* 44 : 1086-1090, 1994
 - 24) Selley ML, Close DR, Stern SE : The effect of increased concentrations of homocysteine on the concentration of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23 : 383-388, 2002
 - 25) Sheu KF, Lilius L, Brown A, Kristal B, Haratounian V, Mohs R, Relkin N, Kalaria R, Basun H, Wahlund LO, Viitanen M, Lannfelt L, Blass JP : Polymorphisms of the DLST gene associate with late-onset and with familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19 : S293, 1998
 - 26) Sheu KF, Brown AM, Kristal BS, Kalaria RN, Lilius L, Lannfelt L, Blass JP : A DLST genotype associated with reduced risk for Alzheimer's disease. *Neurology* 52 : 1505-1507, 1999
 - 27) 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 (NILS-LSA). *J Epidemiol* 10 : S46-55, 2000
 - 28) Strazielle C, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Lalonde R : Regional brain cytochrome oxidase activity in β -amyloid precursor protein transgenic mice with the Swedish mutation. *Neuroscience* 118 : 1151-1163, 2003
 - 29) Swerdlow RH, Kish SJ : Mitochondria in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol* 53 : 341-385, 2002
 - 30) Szabados T, Dul C, Majtenyi K, Hargitai J, Péntes Z, Urbanics R : A chronic Alzheimer's model evoked by mitochondrial poison sodium azide for pharmacological investigations. *Behav Brain Res* 154 : 31-40, 2004
 - 31) Takuma K, Yao J, Huang J, Xu H, Chen X, Luddy J, Trillat AC, Stern DM, Arancio O, Yan SS : ABAD enhances A β -induced cell stress via mitochondrial dysfunction. *FASEB J* 19 : 597-622, 2005
 - 32) Teng FY, Tang BL : Widespread gamma-secretase activity in the cell, but do we need it at the mitochondria? *Biochem Biophys Res Commun* 4 : 1-5, 2005