

Fig. 4. ABAD-transfectants are resistant to oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) Representative fluorescent pictures of nuclei of each transfectant stained with Hoechst33342 (blue; dead and living cells) and PI (pink; dead cells) after treatment for 24 hr with or without 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hr as described in **Materials and Methods**. Scale bar: 50 μm. (B) Percentage of dead cells of each transfectant after treatment with the indicated concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Total and dead cells were enumerated under a fluorescent microscope. Lanes indicate V1 and V2 (control-transfectant) and A1 and A2 (ABAD-transfectant). Data are the mean ± SD of 4 independent experiments and \*p < 0.05 in Student's *t*-test.

by treatment with antimycin A. Considerable dead cells in controls were seen after antimycin A treatment, while ABAD-transfectants were resistant to the treatment (Fig. 3C, D).

As an alternative oxidative stress, we examined effects by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Similarly to 4-HNE- and antimycin A-treatments, ABAD-transfectants were more cytoprotective to the oxidative stress than controls (Fig. 4A, B).

#### 3.4. Cytoprotective role of ABAD is suppressed by Aβ

When cell cultures are exposed to Aβ<sub>1-42</sub>, Aβ<sub>1-42</sub> binds to ABAD [40]. Thus, we examined whether Aβ actually

inhibits ABAD activity in the detoxification of 4-HNE. When cells were treated with Aβ<sub>1-42</sub>, it inhibited the decrease in external 4-HNE only in ABAD-transfectants (Fig. 5A, B). Moreover, Aβ<sub>1-42</sub> inhibited the cytoprotective role by ABAD against the exposure to ROS induced through treatment with antimycin A (Fig. 5C). It was reported that co-overexpression of ABAD and mutant APP induced cytotoxicity [40]. In contrast to this report [40], no cytotoxic effect was observed even in the presence of Aβ without treatment with antimycin A (Fig. 5C). Only when cells were co-treated with Aβ and antimycin A, the difference between ABAD- and control-transfectants was evident. This result suggests that ABAD protects cells by detoxifying 4-HNE.

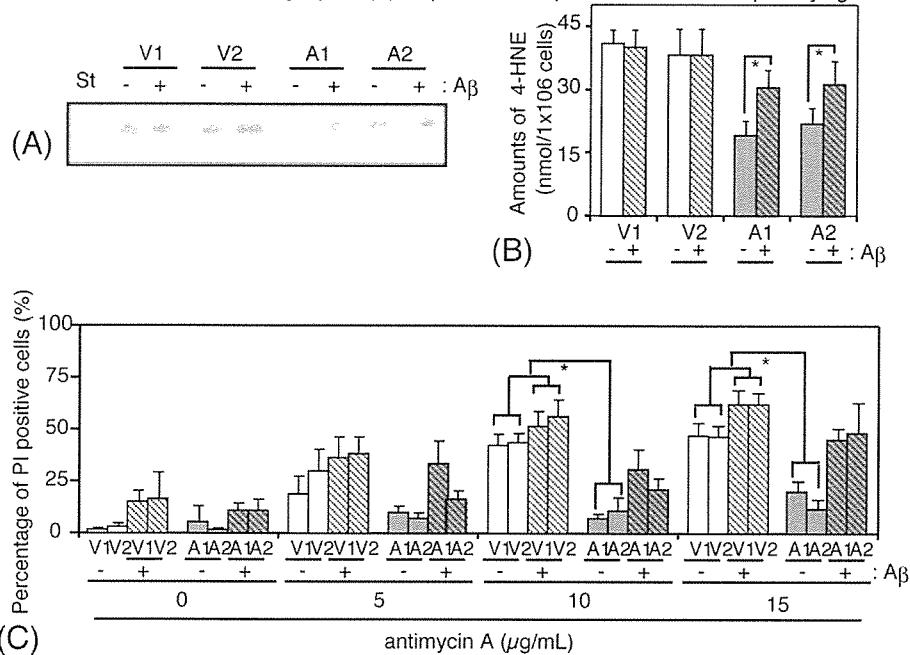
#### 3.5. ABAD is cytoprotective against 4-HNE in neuroblastoma cells

Finally, we examined the cytoprotective role of ABAD against 4-HNE in neuroblastomas. SHSY-5Y cells were transiently transfected with ABAD cDNA and imaged with Mitotraker red and anti-ABAD antibody (Fig. 6A), confirming that ABAD localizes to mitochondria. Then, SHSY-5Y cells were co-transfected with the ABAD and EGFP genes and treated with 4-HNE as described in **Materials and Methods**. EGFP-positive cells were enumerated under fluorescence microscope after 4-HNE-treatment for 24 hr. The 4-HNE-treatment decreased the EGFP-positive cells due to cell death (Fig. 6B, C). Apparently, vector/EGFP co-transfectants were less than ABAD/EGFP (Fig. 6B, C), indicating ABAD-transfectants were more resistant against the 4-HNE-treatment. These results suggested that ABAD catabolizes 4-HNE and protected from cell death in neuroblastoma cells.

## 4. Discussion

Oxidative stress is widely accepted as one of the causes of neurodegenerative disorders including AD. Oxidative stress arises from the strong cellular oxidizing potential of excess ROS. The majority of superoxide anion radicals is generated in mitochondria by electron leakage from the electron transport chain [25]. Antimycin A inhibited smooth electron transport at complex III, and induced the production of superoxides. Superoxides may be converted into hydrogen peroxide, which is a source of the most reactive radical, hydroxyl radical [33]. ROS modifies unsaturated fatty acids to form

Fig. 5. ABAD activity for cytoprotection is inhibited by A $\beta$ . (A) Representative patterns of TLC for quantifying 4-HNE. Transfectants



were pretreated with 1  $\mu$ g/mL A $\beta$  for 14 hr and exposed to external 4-HNE (250  $\mu$ M) for 30 min. External 4-HNE was extracted from the supernatant medium, spotted onto TLC and visualized as described in Materials and Methods. Lanes indicate control (V1 and V2) and ABAD transfectants (A1 and A2). A $\beta$  + and - indicate with and without preincubation with aggregated A $\beta$ . St indicates a spot of standard 4-HNE (12.5 nmol). (B) Intensities of spots with Rf = 0.4 quantified with NIH image to calculate the amounts of 4-HNE remaining in the supernatant. Lanes are shown as in (A). Data are shown as the mean  $\pm$  SD of four independent experiments. \*p < 0.05 in Student's t-test. (C) Percentage of dead cells of each transfectant after pretreatment with A $\beta$  for 14 hr, followed by treatment with antimycin A for 24 hr. After treatment, cells were stained with PI (red) and/or Hoechst33342 (blue). Total (blue) and dead cells (pink) were enumerated under a fluorescent microscope. Lanes are shown as in (A). Data are the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments and \*p < 0.05 in Student's t-test.

peroxides, from which aldehydes such as malondialdehyde (MDA), and highly toxic 4-HNE are non-enzymatically produced. In particular, 4-HNE denatures proteins by modifying lysine, histidine, serine, and cysteine residues [38]. It has also been shown *in vitro* to promote neuronal death [11]. Recently, marked increases in 4-HNE were reported in the hippocampus and superior and middle temporal gyrus of patients with mild cognitive impairment (MCI) and those with early AD compared with healthy individuals [39]. 4-HNE not only induces neuronal death but also causes synapse dysfunction due to mechanisms such as reducing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity [27] and markedly inhibits microtubule formation and neurite outgrowth [21]. Furthermore, there have been a number of reports on the relationship between neurofibrillary tangle (NFT), which is a pathological feature characteristic of AD, and oxidative stress [44]. Concerning 4-HNE in particular, it has been reported to induce structural changes in phosphorylated tau by modifying it and to make tau a structure in NFT [12,

36], so that 4-HNE is considered to play an important role in NFT formation. In a transgenic mouse model of A $\beta$  deposition, LPO accumulation was reported to precede A $\beta$  accumulation [30].

Many enzymes may catabolize 4-HNE for detoxification as follows: aldo-keto oxidoreductases; ALDH; aldosereductase; aldehyde reductase; and alcohol dehydrogenase (ADH) [29]. ALDH2-deficient transfectants were vulnerable to exogenous 4-HNE and accumulated endogenous 4-HNE by treatment with antimycin A [22, 25, 26], which supports our epidemiologic case-control study that mitochondrial ALDH2 deficiency is a risk for late-onset AD [8].

(A) A $\beta$  has recently been shown to exist inside mitochondria, and inhibits the activity of cytochrome c oxidase [1, 4, 34]. Moreover, the link of mitochondria with A $\beta$  was revealed by attractive findings that A $\beta$  binds to ABAD to inhibit its activity, resulting in the excess generation of ROS. A mutant APP gene and the ABAD gene were introduced into transgenic mice to enhance A $\beta$

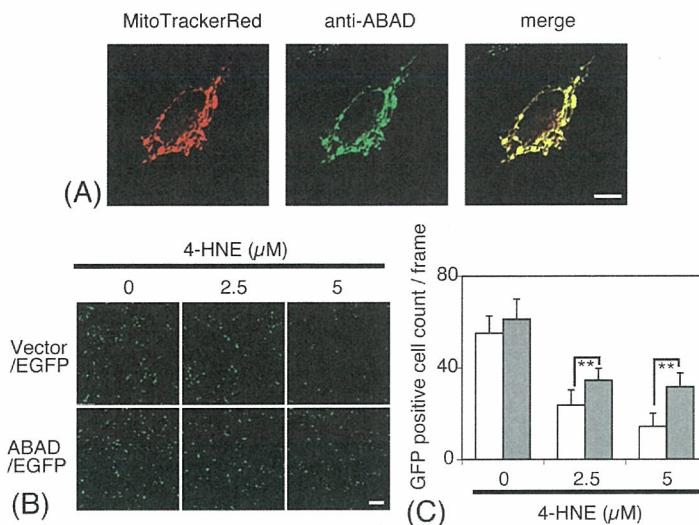


Fig. 6. Neuroblastomas expressing ABAD were resistant against 4-HNE.

(A) SHSY-5Y cells were transiently transfected with ABAD cDNA. Representative images of a transfectant co-stained with MitoTrackerRed (left panel) anti-ABAD (middle panel) and superimposed (right panel) are shown. Scale bar: 10 μm (B) SHSY-5Y cells were transiently co-transfected with EGFP/vector or EGFP/ABAD, treated with the indicated concentration of 4-HNE for 24 hr and observed with a fluorescent microscope. Scale bar: 200 μm. (C) Living cells expressing EGFP were enumerated after 24h treatment with 4-HNE under a fluorescent microscope. Data are the mean ± SD of 4 independent experiments. \*\*p<0.01 in Student's t-test.

production. In transgenic mice, an increase in oxidative stress in neurons was accompanied with memory loss [15].

ABAD was initially reported as endoplasmic reticulum-associated amyloid β-peptide (Aβ)-binding protein (ERAB) [40]. Although there was discrepancy about the location of ABAD in the early stage, this enzyme was accepted to be located in mitochondria [7]. This study confirmed that ABAD localizes to mitochondria.

In this study, we hypothesized that ABAD may have an additional function that catabolizes 4-HNE. Indeed, we verified this hypothesis at least at cultured cell level, although it remains unclear whether ABAD actually functions to detoxify cytotoxic aldehydes in the brain.

ABAD has several functions: in the third step of mitochondrial fatty acid β-oxidation, cycles comprised four sequential reactions, as short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (SCHAD) [5, 10, 14]: additionally, ABAD catalyzed a wide spectrum of substrates, including steroids [6, 7, 41, 42], cholic acids [6, 42], and fatty acid. Thus, if this multifunctional enzyme would have an additional function, it might be reasonable. When we pay attention on mitochondrial fatty acid β-oxidation [32], the β-oxidation is not available in energy metabolism in the brain [2, 3, 19, 28]; however, ABAD, an enzyme involved in the β-oxidation, expresses in the brain [42].

Thus, it suggests that ABAD plays an alternative role in the brain instead of energy metabolism.

ABAD can detoxify 4-HNE only in the presence of NADH as a cofactor in the healthy brain according to our model. Thus, when energy metabolism to generate NADH is declined, the detoxification system by ABAD would not be functional, leading to amplify toxic aldehydes. Since it is known that energy metabolism is poor in the brain of AD, NADH must be not abundant in AD brains. Additionally, activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 has been recently found in AD [9], which consumes NAD<sup>+</sup> to form branched polymers of ADP-ribose on target proteins. Thus, NAD<sup>+</sup> as well as NADH must be exhausted in the brain with AD, which leads to dysfunction of ABAD for detoxifying aldehydes.

In our model, Aβ plays a role towards the accumulation of 4-HNE by inhibiting the ABAD activity in the development of AD. Since 4-HNE stimulates the Aβ production [37], Aβ would in turn enhance to increase by 4-HNE. This vicious cycle could increase Aβ as well as 4-HNE, both of which should contribute to the pathogenesis of AD. Further study will be required to reveal the relationship between AD and ABAD.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministry of Health,

Labour and Welfare (H17-Chouju-009, longevity science) and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (16390257) to Shigeo Ohta.

## References

- [1] Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA. Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem*, 2002; 80(1):91-100.
- [2] Chhina N, Kuestermann E, Halliday J, Simpson LJ, Macdonald IA, Bachelard HS, Morris PG. Measurement of human tricarboxylic acid cycle rates during visual activation by (13)C magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci Res* 2001;66 (5) 737-46.
- [3] Clarke DD, Sokoloff L. Circulation and energy metabolism of the brain. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff SK, Fisher PB, Uhler MD. (Eds.), *Basic neurochemistry*. Lippincott-Raven, Philadelphia; 1999, pp. 637-669.
- [4] Crouch PJ, Blake R, Duce JA, Ciccotosto 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* 2005;25 (3):672–9.
- [5] He XY, Schulz H, Yang SY. A human brain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is identical to an amyloid beta-peptide-binding protein involved in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1998;273(17):10741–46.
- [6] He XY, Merz G, Mehta P, Schulz H, Yang SY. Human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single-domain multifunctional enzyme. Characterization of a novel 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 1999;274(21):15014–19.
- [7] He XY, Merz G, Yang YZ, Mehta P, Schulz H, Yang SY. Characterization and localization of human type10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Eur J Biochem* 2001;268(18):4899-907.
- [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* 2000;273(1):192-6.
- [9] Kauppinen TM, Swanson RA. The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience*. 2006 Nov 1; [Epub ahead of print]
- [10] Kobayashi A, Jiang LL, Hashimoto T. Two mitochondrial 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases in bovine liver. *J Biochem* 1996;119(4):775-82.
- [11] Kruman II, Mattson MP. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem* 1999;72(2):529-40.
- [12] 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. Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radic Biol Med* 2005;38(6):746–54.
- [13] Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP, Markesbery WR. Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997;18(5):457-61.
- [14] Luo MJ, Mao LF, Schulz H. Short-chain 3-hydroxy-2-methylacyl-CoA dehydrogenase from rat liver: purification and characterization of a novel enzyme of isoleucine metabolism. *Arch Biochem Biophys* 1995; 321(1):214-20.
- [15] 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, Kuppasamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H. Aβ directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 2004;304(5669):448-52.
- [16] Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. Mitochondria are a direct site of Ab accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 2006;15(9):1437-49.
- [17] Mark RJ, Pang Z, Geddes JW, Uchida K, Mattson MP. Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci* 1997;17(3):1046-54.
- [18] Maurer I, Zierz S, Moller HJ. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging* 2000;21(3):455-62.
- [19] McCall AL. Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 2004;490(1-3):147-58
- [20] 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* 2002;33(5):620–6.
- [21] Neely MD, Sidell KR, Graham DG, Montine TJ. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits neurite outgrowth, disrupts neuronal microtubules, and modifies cellular tubulin. *J Neurochem* 1999;72(6):2323–33.
- [22] 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* 2003;84(5):1110-7.
- [23] Ohta S. A multi-functional organelle mitochondrion is involved in cell death, proliferation and disease. *Curr Med Chem* 2003;10(23):2485-94.
- [24] Ohta S. Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. *Oncogene*. 2006;25(34):4768-76.
- [25] Ohta S, Ohsawa I. Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects

- in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification. *J Alzheimers Dis.* 2006;9(2):155-66.
- [26] Ohta S, Ohsawa I, Kamino K, Ando F, Shimokata H. Mitochondrial ALDH2 deficiency as an oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1011:36-44.
- [27] Pedersen WA, Cashman NR, Mattson MP. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells. *Exp Neurol* 1999;155(1):1-10.
- [28] Penicaud L, Leloup C, Fioramonti X, Lorsignol A, Benani A. Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9(4):458-62
- [29] Picklo MJ, Olson SJ, Markesbery WR, Montine TJ. Expression and activities of aldo-keto oxidoreductases in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60(7):686-95.
- [30] Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 2001;21(12):4183-7.
- [31] Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1997;68(5):2092-7.
- [32] Schulz H. Beta oxidation of fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1991;1081(2):109-20
- [33] Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 1992;267(2):5317-23.
- [34] Strazielle C, Sturchler-Pierrat C, Staufienbiel M, Lalonde R. Regional brain cytochrome oxidase activity in beta-amyloid precursor protein transgenic mice with the Swedish mutation. *Neuroscience* 2003;118(4):1151-63.
- [35] Suzuki Y, Fujisawa M, Ando F, Niino N, Ohsawa I, Shimokata H, Ohta S. Alcohol dehydrogenase 2 variant is associated with cerebral infarction and lacunae. *Neurology* 2004;63(9):1711-3.
- [36] Takeda A, Smith MA, Avila J, Nunomura A, Siedlak SL, Zhu X, Perry G, Sayre LM. In Alzheimer's Disease, Heme Oxygenase Is Coincident with A $\beta$ 50, an Epitope of  $\tau$  Induced by 4-Hydroxy-2-Nonenal Modification. *J Neurochem* 2000;75(3):1234-41.
- [37] Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, Santoro G, Davit A, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M. Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J Neurochem* 2005;92(3):628-36.
- [38] Uchida K, Stadtman ER. Modification of Histidine Residues in Proteins by Reaction with 4-Hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(10):4544-8.
- [39] Williams TI, Lynn BC, Markesbery WR, Lovell MA. 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* 2006;27(8):1094-9.
- [40] Yan SD, Fu J, Soto C, Chen X, Zhu H, Al-Mohanna F, Collison K, Zhu A, Stern E, Saïdo T, Tohyama M, Ogawa S, Roher A, Stern D. An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1997;389(6652):689-95.
- [41] Yang SY, He XY, Schulz H. 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in human health and disease. *FEBS J* 2005a;272(19):4874-83.
- [42] Yang SY, He XY, Schulz H. Multiple functions of type 10 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Trends Endocrinol Metab* 2005b;16(4):167-75.
- [43] Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(7):2696-701.
- [44] Zarkovic K. 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* 2003;24(4-5):293-303.

総説

## アルツハイマー病の危険因子である酵素活性欠損型アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子

— その分子メカニズムとモデル動物の開発 —

大澤 郁朗, 太田 成男

### はじめに

アルツハイマー病 (AD) をはじめとする加齢に伴う神経変性疾患の発症に対してもっとも普遍的な危険因子は老化である。しかし、老化がなぜ危険因子となるのかについての明確な答えはない。細胞を構成する蛋白質、核酸、脂質などの物質が年数を経るにつれ変性し、それが細胞及び個体の変性、すなわち老化を引き起こすとされている。その変性を引き起こす主体となるものが酸化ストレスであることが明らかとなってきた。生命体は、その維持と活動に必要な代謝エネルギーを効率良く生み出すために 27 億年の昔から酸素を利用するようになった。真核細胞においては、主にミトコンドリアで 85

～90% の酸素がエネルギー代謝に用いられる。しかし、その過程では常に電子の漏れが生じ、その電子によって酸素が還元されて活性酸素種 (ROS) となり、細胞に酸化ストレスを与える。その為、ミトコンドリアの内外でこの酸化ストレスを除去する機構が存在し、常に細胞を防御している。この防御機構が疲弊すると老化は促進される。従って、AD などの神経変性疾患が発症する危険性が增大することが予想される。

本稿では、アルコール代謝に関わっているとされてきたミトコンドリアのアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) が、酸化ストレスによる脂質の過酸化で派生する毒性の高いアルデヒド類を除去する酵素であることを概説し、ALDH2 酵素活性欠損型遺伝子の保持が AD の危険因子である原因を分子レベルで論じる。さらに ALDH2 活性を抑制したトランスジェニック・マウスでは加齢に伴う神経変性と空間的学習能力の低下が認められたので、その一部について紹介する。

The deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a risk factor of Alzheimer's disease: Its molecular mechanism and a model animal

Ikuroh Ohsawa, Shigeo Ohta

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 川崎市中原区小杉町 1-396]

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 211-8533, Japan)

### 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<sup>+</sup> 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

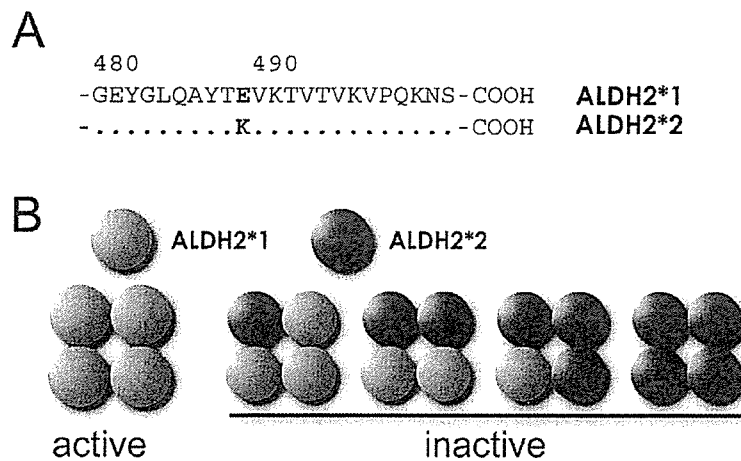


図 1. *ALDH2* 遺伝子多型

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

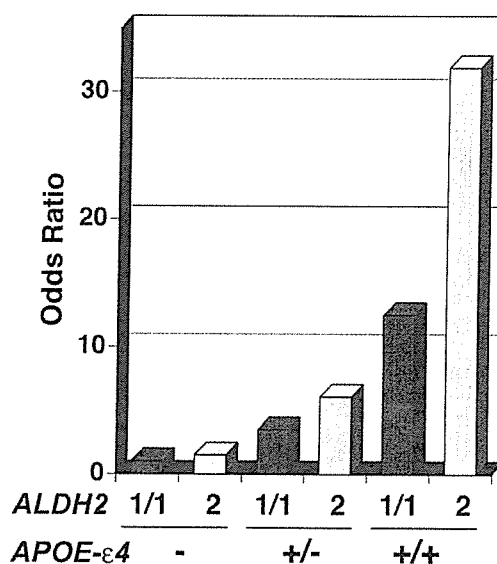


図 2. 孤発性アルツハイマー病における ALDH2\*2 と APOE  $\epsilon 4$  の発症危険性にたいする相乗効果  
ALDH2 の (1/1) は ALDH2\*1 アレルをホモで保持する者を (2) は ALDH2\*2 アレルをヘテロまたはホモで保持する者を表す。APOE  $\epsilon 4$  の (-) は  $\epsilon 4$  アレルを保持しない者を、(+/-) はヘテロで、(+/+) ホモで保持する者をそれぞれ表す。ALDH2\*2 アレルを持ち、APOE  $\epsilon 4$  アレルがホモの者では、どちらも保持しない者に対して、AD 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

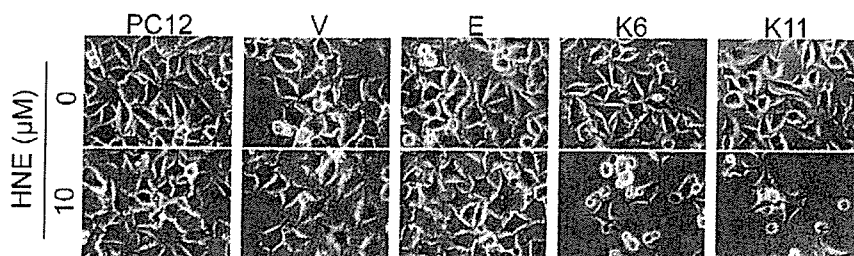


図3. 4-HNEに対して脆弱となった *ALDH2\*2* 遺伝子導入PC12細胞  
PC12細胞に *ALDH2\*2* 遺伝子を導入してドミナント・ネガティブにALDH2活性を抑制した株 (K6, K11) では, ALDH2活性を保持する親株 (PC12), ベクター導入株 (V), *ALDH2\*1* 遺伝子導入株 (E) では死なない濃度の4-HNEでも, 顕著な細胞死が見られた.

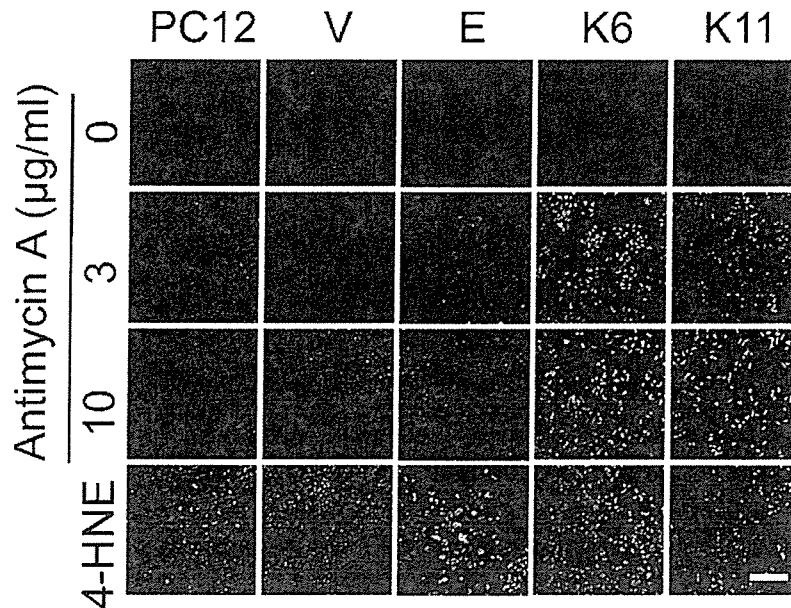


図4. ALDH2 活性の抑制による 4-HNE の蓄積促進  
呼吸鎖阻害剤アンチマイシン A を添加して ROS を発生させ、24 時間後の細胞内 4-HNE をその特異的抗体で検出した。ALDH2 活性を抑制した株では、顕著な 4-HNE の蓄積が認められる。細胞株については、図3 参照。

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

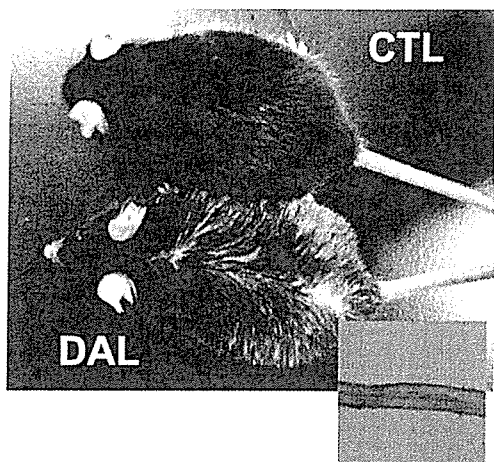


図 5. DAL マウス  
6ヶ月齢の DAL マウス雄. 体毛に白髪が見られ, 色素が抜けている (挿入写真). CTL は同齢の C57BL/6 雄.

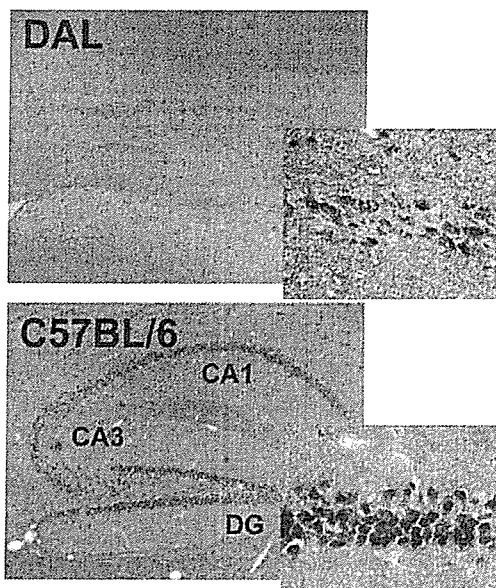


図 7. DAL マウスにおける海馬の萎縮と錐体細胞の変性  
DAL マウス (雌) では, 18ヶ月齢で顕著な海馬の萎縮と錐体細胞の変性が認められる. HE 染色. 挿入図は CA1 領域を拡大したもの.

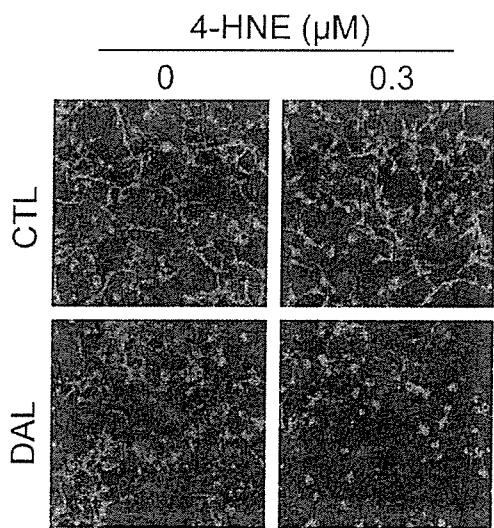


図 6. 4-HNE に対して脆弱となった DAL マウスの大脳皮質神経細胞.  
脳で ALDH2\*2 が発現している DAL マウス胎児大脳皮質から初代培養神経細胞を調製し, これに 4-HNE を添加して 24 時間後の細胞を固定, 神経細胞特異的抗体である抗 TUJ-1 抗体により生存神経細胞を染色した. コントロール (CTL) の C57BL/6 より調製した神経細胞に比べ, DAL マウス神経細胞では低濃度の 4-HNE で細胞死が見られる.

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

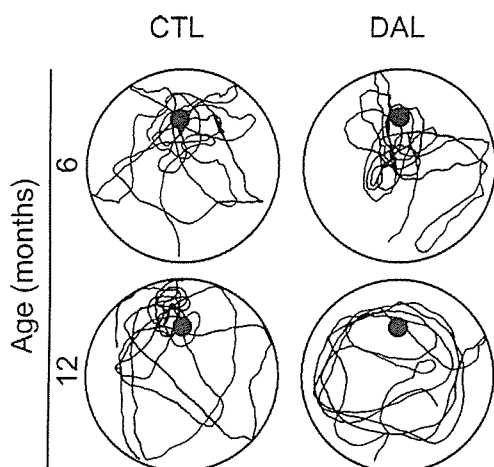


図 8. 加齢に伴う DAL マウスの学習能力低下  
5 日間の水迷路学習後にプラットフォームを除去し、60 秒間のプローブテストを実施したときの泳路を示す。DAL マウス(雌)は 6ヶ月齢ではプラットフォームがあった位置(黒丸)を記憶してその周囲を遊泳したが、12ヶ月齢ではプラットフォームの位置に関係なくプール内を泳ぎ廻った。コントロール(CTL)は、C57BL/6 雌。

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為である、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るだろうか？

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、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  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、 $\beta$  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

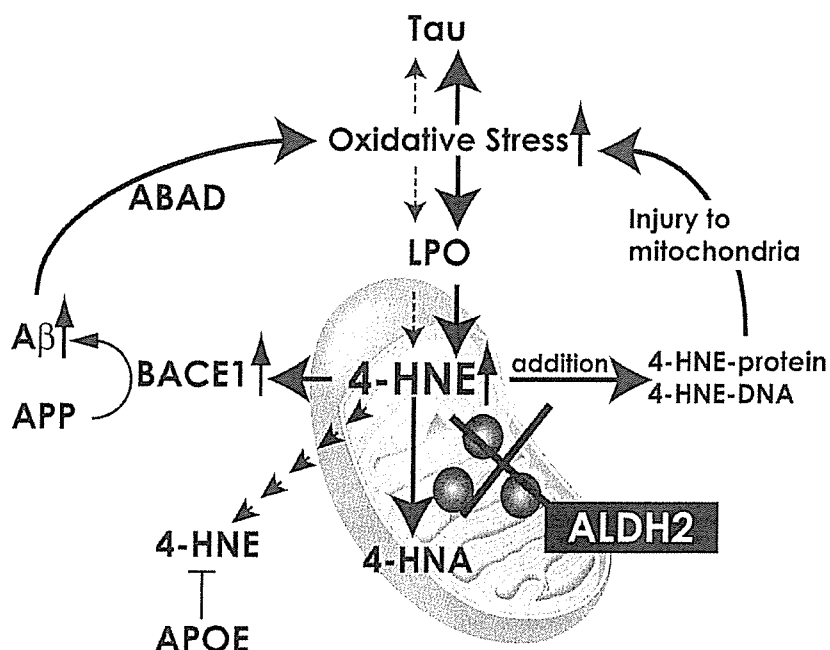


図9. ALDH2 活性の抑制による 4-HNE の蓄積とその影響についてのモデル  
 ミトコンドリアにおいて、ALDH2 活性の低下は酸化ストレスによって生じる 4-HNE 蓄積を促進し、これが蛋白や DNA に結合することでミトコンドリア障害を引き起こす。その障害により酸化ストレスは亢進され細胞死に至る。このプロセスが加齢により加速されるため、ALDH2 活性低下は AD など神経変性疾患のリスクとなる。4-HNE を含む酸化ストレスはタウのリン酸化と構造変化をもたらし NFT 形成を促進する。また、4-HNE は BACE1 の発現を上昇させて Aβ の蓄積を促進する。さらに Aβ は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

## 文 献

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kruman II, Mattson MP (1999) Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem* 72: 529-540.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Neely MD, Sidell KR, Graham DG, Montine TJ (1999) The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits neurite outgrowth, disrupts neuronal microtubules, and modifies cellular tubulin. *J Neurochem* 72: 2323-2333.
- 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.
- 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, Liun 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 (dihydrolipoamide 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 MIRT D 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  $\beta$  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,  $\beta$  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、 $\text{NAD}^+$  と  $\text{FAD}$  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  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  によって  $\text{Na}^+$  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 Y500 論文 JCLS

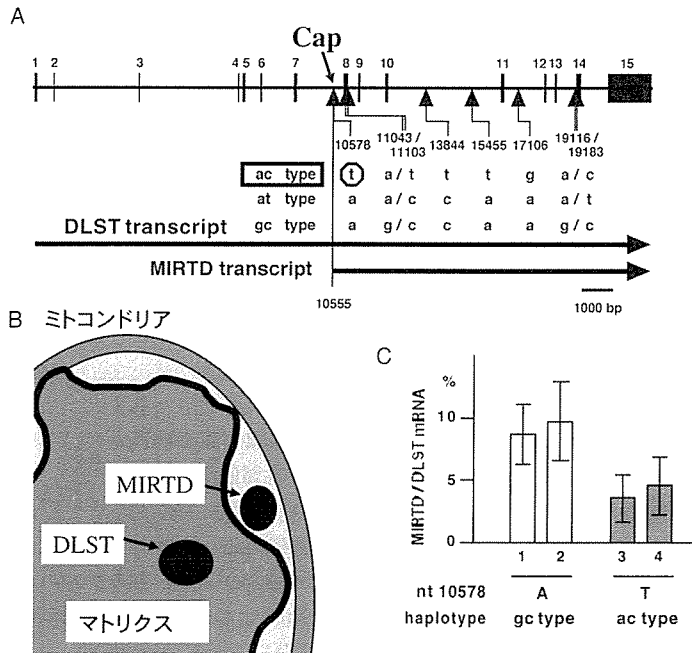


図1 DLST 遺伝子は二重機能性遺伝子

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 MIRTMD 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 MIRTMD は、ミトコンドリアの内膜と外膜の膜間腔に存在する。C: MIRTMD 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、MIRTMD の転写頻度が低い。

関与するというだけではなく、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  $\alpha$ -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

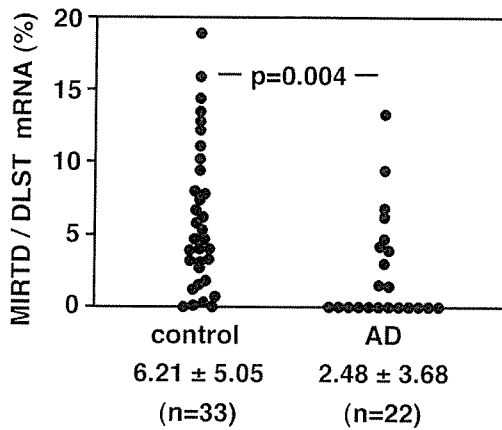


図2 アルツハイマー病患者脳および高齢者脳の剖検脳によるMIRT Dの発現  
MIRT DのmRNA量とDLST mRNAの比率を求めた。MIRT Dの発現量は個人差が大きい、アルツハイマー病では対照に比べて有意に少なく、半数の患者脳ではMIRT D mRNAは検出できなかった。

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、

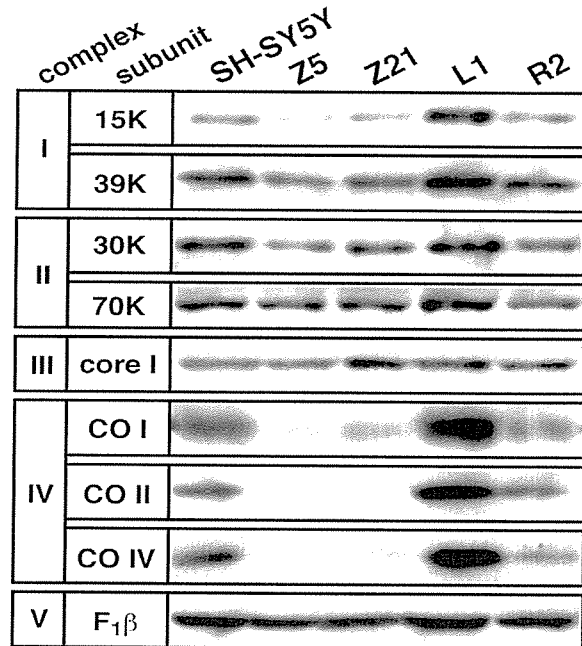


図3 MIRT D発現低下細胞におけるシトクロムc酸化酵素と複合体Iの分子集合の欠損

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