

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MIRTD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 Y 500 論文 JCLS

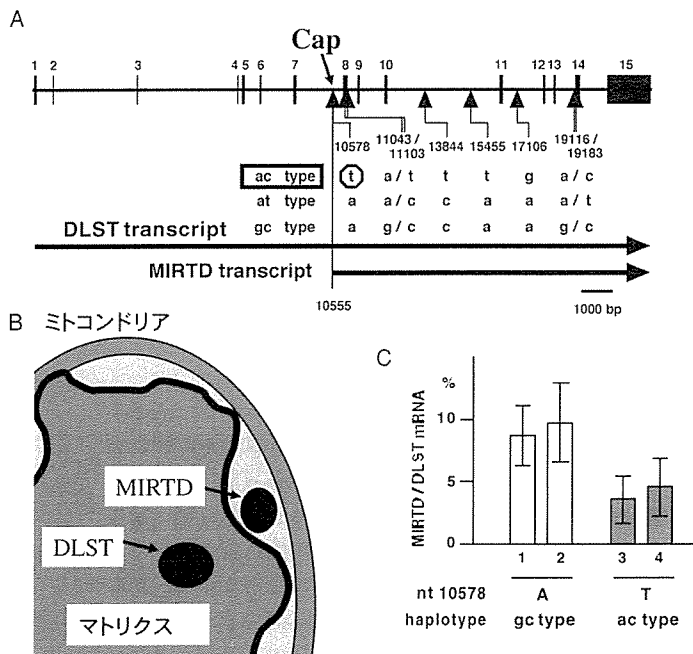


図 1 DLST 遺伝子は二重機能性遺伝子

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 MIRT 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 MIRT は、ミトコンドリアの内膜と外膜の膜間腔に存在する。C: MIRT 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、MIRT 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。

I. 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、プレズニリン-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)。おそらくは、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

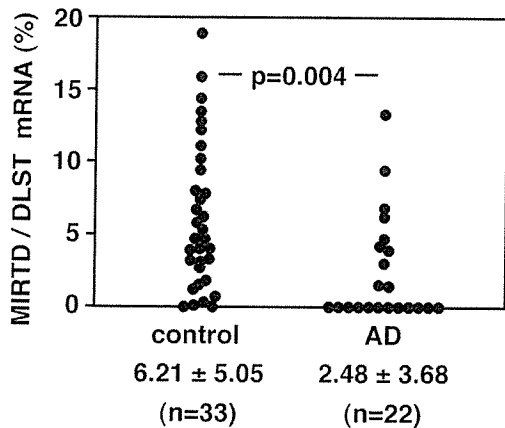


図2 アルツハイマー病患者脳および高齢者脳の剖検脳による MIRT D の発現
MIRT D の mRNA 量と DLST mRNA の比率を求めた。MIRT D の発現量は個人差が大きい、アルツハイマー病では対照に比べて有意に少なく、半数の患者脳では MIRT D mRNA は検出できなかった。

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、

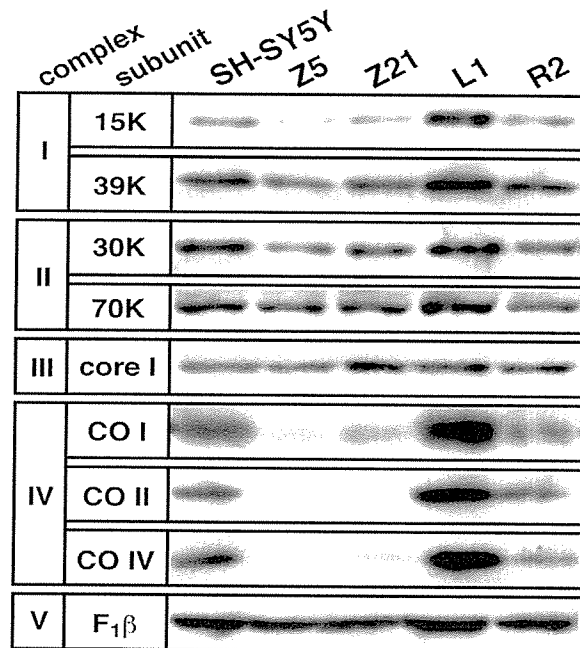


図3 MIRT D 発現低下細胞におけるシトクロム c 酸化酵素と複合体 I の分子集合の欠損

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、COXIV 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

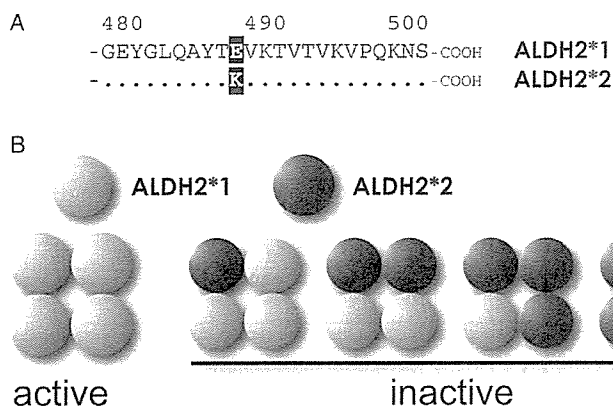


図 4 ALDH2 遺伝子多型と酵素活性

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、不活性型となる(図4A)。酵素活性型(487E)をALDH2*1と呼び、不活性型(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。

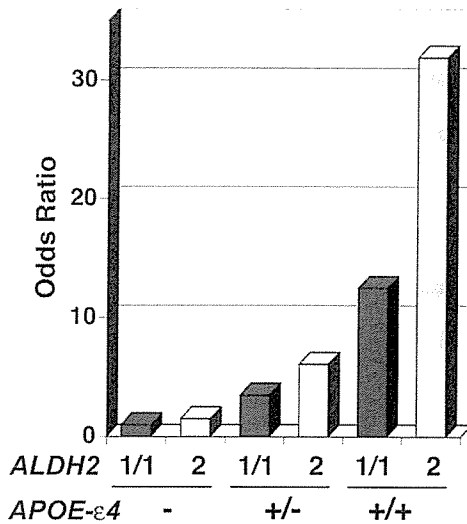


図 5 孤発性アルツハイマー病における ALDH2 遺伝子多型と APOE-ε4 の相乗効果
アルツハイマー病 447 人と、地域、年齢、性別を一致させた対照 447 人のアルツハイマー病発症頻度を比較した。ALDH2 の 1/1 は ALDH2*1 のホモ, 2 は ALDH2*2 を持つ人(ホモとヘテロの合計)。APOE-ε4 (-) はなし, (+/-) はヘテロ, (+/+) はホモ。ALDH2*2 を持ち, APOE-ε4 ホモの人はオッズ比にして最大 31 の発症頻度となる。対応する人は日本人の 1% 程度。

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で、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。

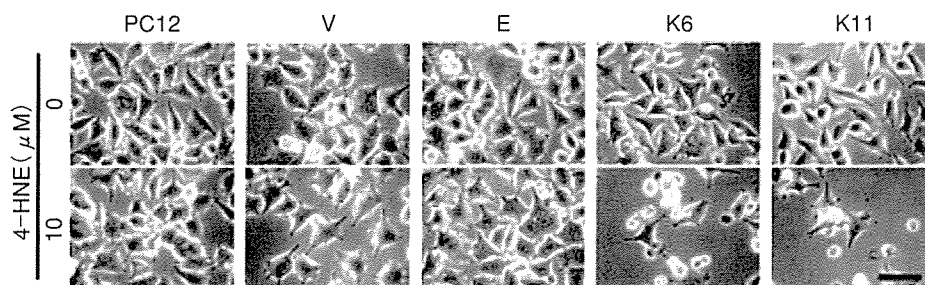
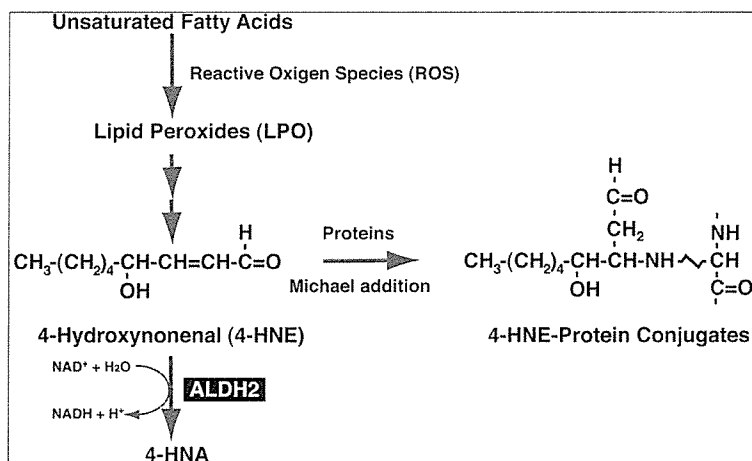


図7 マウス型 ALDH2*2 を導入したラット PC12 の 4-HNE に対する脆弱性
PC12 にマウス型 aldh2*2 遺伝子を導入し、ALDH2 活性を低下させた(クローン K6, K11)。4-HNE を加えると ALDH2 活性を持つクローンではほとんど死なないのに対し、ALDH2 酵素活性のない K6 と K11 は容易に死滅した。

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的な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 Aβ

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 (Aβ) 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、Aβ 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、Aβ 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-Aβ 複合体の結晶構造解析によると、Aβ 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-Aβ 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 Aβ 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。Aβ 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

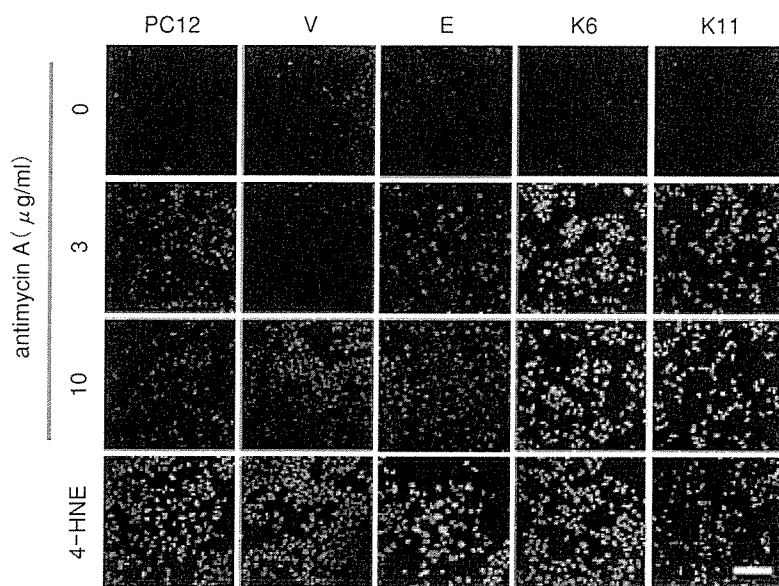


図 8 ALDH2 活性と 4-HNE の蓄積

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)。

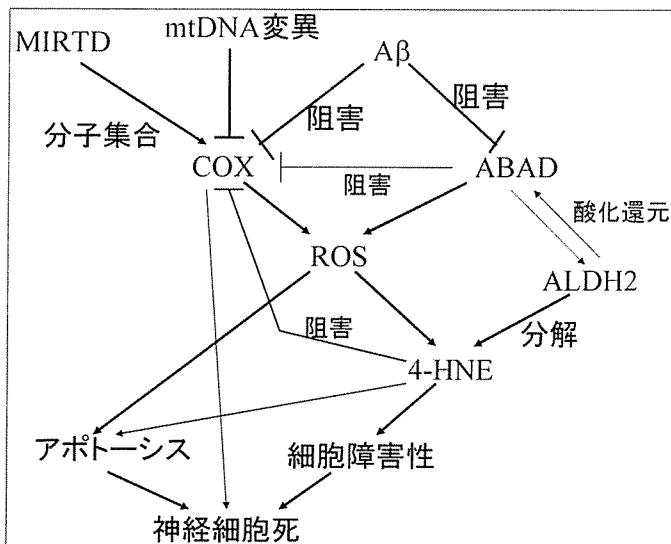
さらに、アルツハイマー病患者脳の mtDNA を調べると、検出できるくらいに変異が蓄積している場所があり、しかもそこは転写制御領域であった。アルツハイマー病患者脳でみられた変異の蓄積によって転写が低下し、COX の活性が低下していた (Coskun et al, 2004)。mtDNA の体細胞変異によって、COX などのミトコンドリア機能が低下するのも、アルツハイマー病の発症の一原因と言ってもいいだろう。

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 MIRT1 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, Ciccosto 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

Abstract

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

Shigeo Ohta

from

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.

Mitochondrion is a multifunctional organelle. Apoptosis as well as necrosis is closely related with mitochondrial functions. Damage to mitochondria causes a decline in ATP synthesis and an increase in the generation of reactive oxygen species (ROS). ROS damage various molecules including DNA, protein and lipid and induce apoptosis. Evidence has recently emerged that oxidative stress is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Moreover, it has been shown that amyloid β peptide is involved in enhancing oxidative stress.

Here, the author focus on the involvement of dysfunction in mitochondria with AD and review recent approaches to the molecular pathogenesis of AD.

First, the author would like to describe the involvement of deficiency of molecular assembly of cytochrome c oxidase (COX). Dihyrolipoamide succinyltransferase (DLST) is a subunit-enzyme of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex of the Krebs cycle. While studying how the *DLST* genotype contributes to the pathogenesis of AD, we found a novel mRNA that is transcribed starting from intron 7 in the *DLST* gene. The novel mRNA level in the brain of AD patients was significantly lower than that of controls. The truncated gene product (designated MIRTMD) localized to the intermembrane space of mitochondria. To investigate the function of MIRTMD, we established human neuroblastoma SH-SY5Y cells expressing a maxizyme, a kind of ribozyme, that specifically digests the MIRTMD mRNA. The expression of the maxizyme specifically eliminated the MIRTMD protein and the resultant MIRTMD-deficient cells exhibited a marked decrease in the amounts of subunits of the COX complex of the mitochondrial respiratory chain, resulting in a decline of activity. A pulse-label experiment revealed that the loss of the subunits is a post-translational event. Thus, the *DLST* gene is bifunctional and MIRTMD transcribed from the gene contributes to molecular assembly of the mitochondrial respiratory complex, including COX.

Second, the author review on oxidative stress caused by a deficiency of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2). ALDH2 is involved in ethanol metabolism by playing a major role in acetaldehyde detoxification. A polymorphism of the ALDH2 gene is specific to north Asians. Sensitivity to ethanol is highly associated with this polymorphism (*ALDH2**2 allele), which is responsible for a deficiency of ALDH2 activity. We at first show that this deficiency influences the risk for late-onset Alzheimer's disease (LOAD) by a case-control study in a Japanese population. In a comparison of 447 patients with sex, age and region-matched non-demented controls, the genotype frequency for carrying the *ALDH2**2 allele was significantly higher in the patients than in the controls ($p=0.001$). Next, we examined the combined effect of the *ALDH2**2 and apolipoprotein E 4 allele (*APOE*- ϵ 4), which has been confirmed to be a risk factor for LOAD. The *ALDH2**2 allele more significantly affected frequency and onset-age in patients with *APOE*- ϵ 4 than without. These results indicate that the ALDH2 deficiency is a risk factor for LOAD, acting synergistically with the *APOE*- ϵ allele. Next, to elucidate the molecular mechanism involved, we obtained ALDH2-deficient cell lines by introducing mouse mutant *Aldh2* cDNA into PC12 cells. We speculate that ALDH2 may function to oxidize toxic aldehyde derivatives. Then, we found that the ALDH2-deficient transfectants were highly vulnerable to exogenous 4-hydroxy-2-nonenal, an aldehyde derivative generated from peroxidized fatty acids. In addition, the ALDH2-deficient transfectants were sensitive to oxidative insult induced by antimycin A, accompanied by an accumulation of proteins modified with 4-hydroxy-2-nonenal. Mitochondrial ALDH2 functions as a protector against oxidative stress.

Finally, the author would like to review on the direct involvement of A β with mitochondrial dysfunctions, through inhibition of COX activity and enhancement of oxidative stress via A β -binding alcohol dehydrogenase (ABAD) which is located in mitochondria.

(Received : April 4, 2005)

Yoshihiko Suzuki · Fujiko Ando · Ikuroh Ohsawa
Hiroshi Shimokata · Shigeo Ohta

Association of alcohol dehydrogenase 2*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese

Received: 11 July 2005 / Accepted: 13 September 2005 / Published online: 24 November 2005
© The Japan Society of Human Genetics and Springer-Verlag 2005

Abstract The Japanese have a polymorphism in the alcohol dehydrogenase 2 gene (*ADH2*). The alleles of *ADH2* (*ADH2*1* and *ADH2*2*) encode more active and less active forms for ethanol metabolism, respectively. We examined whether liver damage and the insulin–glucose axis vary according to *ADH2* genotype in the Japanese. The 2,232 subjects (1,126 men and 1,106 women) were recruited from a population-based prospective cohort study. Clinical evaluations including alcohol consumption, percentage of alcohol drinkers, plasma glucose, HbA1c, insulin, AST, ALT, γ -GTP, and prevalence of diabetes were compared among the *ADH2* genotypes. The percentage of drinkers, alcohol consumption, AST, ALT, and γ -GTP were higher in group *ADH2*1/1* than in group *ADH2*1/2* or *ADH2*2/2* (all $P < 0.05$). Hence, *ADH2*1/1* is associated with excess alcohol intake and liver disorders. However, the prevalence of diabetes did not differ among the three groups. For the glucose–insulin axis, we examined subjects who did not receive insulin therapy or oral anti-diabetes medication. While amounts of alcohol consumed and glucose levels were nearly the same between *ADH*1/2* and *ADH2*2/2*, insulin concentrations were lower in *ADH2*2/1* than in *ADH2*2/2* ($P < 0.05$ in men). This finding suggests that the *ADH2*1* allele is associated with a lower insulin concentration when alcohol intake is light or moderate. It also suggests that the genetic

effect of *ADH2*1* plays an important role in alcohol drinking behavior and in the occurrence of liver injury, but the effect is so mild that it does not influence the glucose–insulin axis or prevalence of diabetes.

Keywords Alcohol dehydrogenase 2 · *ADH2* · Diabetes · Insulin resistance · Liver dysfunction · Alcohol · Prospective cohort study

Abbreviations: ALDH: Aldehyde dehydrogenase · ADH: Alcohol dehydrogenase · PCR: Polymerase chain reaction

Introduction

A reduced incidence of type 2 diabetes has been observed among drinkers in several large prospective studies. Conigrave et al (2001) reported a 12-year prospective study in a cohort of 46,892 US male health professionals, in which 1,571 new cases of type 2 diabetes were reported. The frequency of alcohol consumption was inversely associated with diabetes. Hu et al (2001) reported a large cohort study of 84,941 female nurses from 1980 to 1996, in which abstinence from alcohol use was associated with a significantly increased risk of diabetes. In contrast, other studies (Holbrook et al 1990) have shown an increased risk of diabetes among a proportion of subjects in the top alcohol consumption category. In Japanese men, Tsumura et al (1999) reported that heavy drinking is associated with an increased risk of type 2 diabetes, while moderate drinking is associated with a decreased risk of type 2 diabetes, showing a U-shaped relationship.

The genotypes involved in ethanol metabolism are now known to be associated not only with drinking, but also with longevity and oxidative stress parameters (Ohsawa et al 2003). In Japanese, the pharmacokinetics of alcohol metabolism have been well studied. Alcohol dehydrogenase (ADH) is one of the key enzymes in alcohol metabolism. Class I ADH isoenzymes, encoded

Y. Suzuki (✉) · I. Ohsawa · S. 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
E-mail: dr-suzuki@nifty.com

Y. Suzuki
Hokendohjin Medical Foundation,
Tokyo, Japan

F. Ando · H. Shimokata
Department of Epidemiology,
National Institute for Longevity Sciences,
Obu, Aichi 474-8522, Japan

by *ADH1*, *ADH2* and *ADH3*, form dimers among the isoenzymes and oxidize ethanol and other small aliphatic alcohols (Borson et al 1988). About 85% of the Japanese population are carriers of the β 2-subunit encoded by the *ADH2*2* allele, while isoenzymes with the β 2-subunit have been found in only 5% or less of Europeans and white Americans. The β 1- and β 2-subunits differ by only one amino acid residue: Arg-47 in the NAD(H) pyrophosphate-binding site is substituted with His-47 in the β 2-subunit. *ADH2* functions as a dimer and the β 2 β 2 dimer exhibits about 100 times more catalytic activity for ethanol oxidation than the β 1 β 1 dimer at physiological pH (Borson et al 1988), whereas the β 1 β 2 heterodimer exhibits nearly the same activity as the β 1 β 1 homodimer. Thus, relative enzymatic activities of *ADH2*1/1:ADH2*1/2:ADH2*2/2* can be estimated as 1:26:100 if a dimer were to form between the subunits of *ADH2*1* and *ADH2*2* (Borson et al 1988; Yoshida et al 1981).

Several studies (Higuchi et al 1996; Yamauchi et al 2001) have reported that the *ADH2* genotype is associated with excess alcohol intake and alcohol-related disorders in the Japanese population. We have previously reported that the *ADH2* genotype affected LDL-cholesterol levels and the occurrence of cerebral infarction in a community-dwelling Japanese population (Suzuki et al 2004). We therefore examined whether the glucose–insulin axis or prevalence of diabetes is associated with the *ADH2* genotype in the same Japanese population.

Research design and methods

The National Institute for Longevity Sciences–Longitudinal Study of Aging (NILS–LSA), a population-based prospective cohort study of aging and age-related diseases, was begun in 1997 (Ohsawa et al 2003; Shimokata et al 2000; Yamada et al 2002). All participants were independent residents of the Aichi prefecture in Japan. Residents aged 40–79 years old were randomly selected from the register in co-operation with the local government.

The area of study is located in the south of Nagoya City. It is a commuter town and contains an industrial area belonging to the Toyota group, but it has many orchards and farms, so it has both urban and rural characteristics. This area is geographically located in the center of Japan, and its climate is average for Japan. We examined a representative sample of the area's population via a national postal questionnaire of prefecture-stratified random samples of 3,000 households from all prefectures in Japan, and previously showed that the lifestyle of people in this area was the most typical of all areas in Japan.

The sample consisted of 2,232 subjects (1,126 men and 1,106 women) who were randomly recruited. We refer to them as “subjects-1.” Subjects-1 was stratified by both age and sex. Randomly selected men and women were invited, by mail, to attend an explanatory

meeting. At the meeting, the procedures for each examination and follow-up schedule were fully explained. Written informed consent to the entire procedure was obtained from each participant. Participants in the present study were recruited from subjects examined in 1997–1999. The study protocol was approved by the Committee on the Ethics of Human Research of National Chubu Hospital and the National Institute for Longevity Sciences.

Descriptions of the physical examinations performed have been published before (Ohsawa et al 2003; Shimokata et al 2000; Yamada et al 2002). In brief, lifestyle, medical history and prescribed drugs were examined by questionnaire. Anthropometric measurements were taken by a physician. A drinker is defined as a subject who has drunk more than 5 g of alcohol on average per day during the past year. Amounts of alcohol consumed were carefully examined by taking pictures before and after drinking as well as with questionnaires. The percentage of non-smokers to smokers was also noted.

Venous blood was collected early in the morning after at least 12 h fasting. The mean of two determinations of blood chemistry data was obtained for each participant. Clinical evaluations included gender, age, height, body-mass index, smoker status, alcohol consumption, percentage of alcohol drinkers, and blood chemistry (fasting plasma glucose (FPG), HbA1c, insulin, AST, ALT, and γ -GTP levels). Diagnosis of diabetes was based on medical records, or it was defined as a FPG concentration greater than 126 mg/dl or an HbA1c of more than 6.5%, and/or if medication was taken to lower the blood glucose level. Namely, not all subjects whose FPG level was greater than 110 mg/dl did not receive the 75 g oral glucose tolerance test according to the criteria of the Japan Diabetes Society. In the analysis of glucose–insulin associated parameters, to exclude the effect of medications, the diabetic patients who received insulin therapy or oral medications for diabetes were excluded from subjects-1, and the remaining subjects were defined as the “subjects-2” group.

Genotyping of *ADH2*

Samples of DNA were isolated from peripheral blood cells. Genotypes were determined with a fluorescence-based allele-specific DNA primer-probe assay system (Toyobo Gene Analysis, Tsuruga, Japan). To determine the genotype with the G214A substitution (Arg-47-His), the polymorphic region of *ADH2* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with an antisense primer labeled at the 5' end with biotin (5'-GATGGTGGCTGTAGGAATCTG-3') and a G allele-specific sense primer labeled with FITC (5'-CCACGTGGT-CATCTGTNCG-3') or A allele-specific sense primer labeled with Texas red (5'-AACCACGTGGTCATCTGTNTG-3').

Table 1 Comparison of parameters among three groups of men (subjects-1), divided according to *ADH2* genotype. Right columns indicate *P*-values of statistical differences between two groups

| Variables | Men | | | <i>P</i> -value | | |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|
| | 2/2 | 1/2 | 1/1 | 2/2 vs. 1/2 | 2/2 vs. 1/1 | 1/2 vs. 1/1 |
| Subjects-1 <i>n</i> = | 689 | 378 | 59 | | | |
| Age (years) | 59.5 ± 0.4 | 58.9 ± 0.6 | 58.0 ± 1.4 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Height (cm) | 164.4 ± 0.2 | 164.7 ± 0.3 | 164.6 ± 0.8 | n.s. | n.s. | n.s. |
| BMI | 23.0 ± 0.1 | 22.8 ± 0.1 | 22.9 ± 0.4 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Smoking (%) | 61/39 | 63/37 | 63/37 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Alcohol (g/day) | 28.8 ± 1.4 | 29.5 ± 1.9 | 44.5 ± 4.8 | n.s. | 0.0049** | 0.0102** |
| Drinkers (%) | 67.0 | 67.1 | 85.5 | (<i>P</i> < 0.0175) | | |
| AST (IU/l) | 26.6 ± 0.7 | 26.6 ± 0.9 | 33.6 ± 2.3 | n.s. | 0.0038** | 0.0049** |
| ALT (IU/l) | 27.1 ± 0.9 | 26.8 ± 1.2 | 34.3 ± 3.0 | n.s. | 0.02* | 0.02* |
| γ-GTP (IU/l) | 58.2 ± 3.1 | 57.3 ± 4.1 | 80.3 ± 10.5 | n.s. | 0.04* | 0.04* |
| Diabetics (%) | 13.3 | 13.3 | 13.6 | n.s. | n.s. | n.s. |

AST 2/2 ± 1/2 vs. 1/1, *P* < 0.0033; ALT 2/2 ± 1/2 vs. 1/1, *P* < 0.02; γ-GTP 2/2 ± 1/2 vs. 1/1, *P* < 0.04; drinkers 2/2 ± 1/2 vs. 1/1, *P* < 0.005; alcohol 2/2 ± 1/2 vs. 1/1, *P* < 0.005

**P* < 0.05

***P* < 0.01

Statistical analysis

Data are presented as means ± SE. The statistical significance of any difference in mean values and frequencies was determined with the Student's *t*-test or the Tukey–Kramer test. We used a one-way analysis of variance to test for overall differences among multiple groups, and the Fisher LSD post hoc test to identify which group differences accounted for the significant *P*-value. The significance of deviation from Hardy–Weinberg equilibrium was analyzed using the chi-square test. A *P*-value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Influence of *ADH2* genotypes on drinking behavior and liver function

Among the 2,232 subjects, 1,355 (men 689, women 666) had the *ADH2**2/2 genotype, 759 (men 378, women 381) had the *ADH2**2/1 genotype, and 118 (men 59,

women 59) had the *ADH2**1/1 genotype. The *ADH2**2/2, *ADH2**2/1, and *ADH2**1/1 genotypes were in Hardy–Weinberg equilibrium. There was no gender difference.

First, we compared the percentage of drinkers dependent upon *ADH2* genotype. The percentage of drinkers was significantly higher in both men and women in the *ADH2**1/1 group, showing overall differences among the groups (Table 1 and Fig. 1a). The difference was statistically significant according to the Fisher LSD post hoc test in men (*P* < 0.0175), women (*P* < 0.0166), and total subjects-1 (*P* < 0.0033) (Table 1). Moreover, amounts of alcohol consumed were much higher in the *ADH2**1/1 group than the other *ADH2* groups in men and total subjects-1 (*P* < 0.01 in *ADH2**2/2 vs. *ADH2**1/1 and *P* < 0.05 in *ADH2**1/2 vs. *ADH2**1/1) (Tables 1, 3 and Fig. 1b). On the other hand, no significant difference in alcohol consumption among *ADH2**1/1 and the other groups was found in women, probably because much less alcohol was consumed by women than men (Table 2 and Fig. 1b). For smoking (percentage of non-smokers to smokers), there was no difference according *ADH2* genotype in men and in women.

Fig. 1a, b Correlation of *ADH2* genotype with alcohol drinking behavior. **a** Percentage of drinkers in three groups based on *ADH2* genotype. Values in parentheses indicate the total number of subjects (white bars men, gray bars women, and black bars total subjects). **b** Average amounts of alcohol consumed per day. Subjects in the *ADH2**1/1 group drink more alcohol than those in the *ADH2**2/2 and *ADH2**1/2 groups

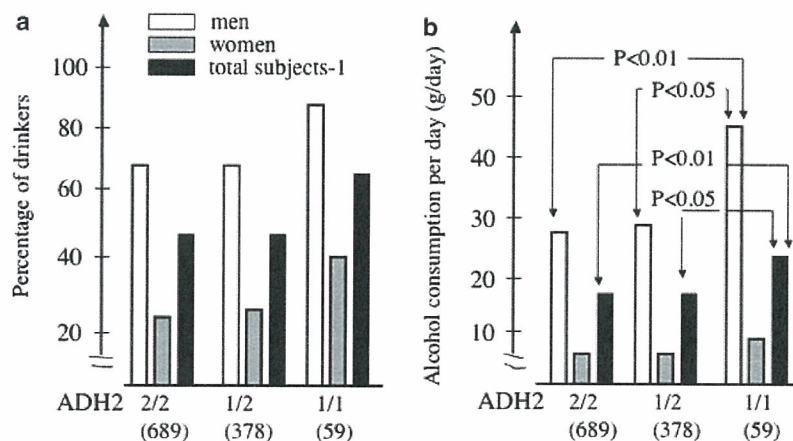


Table 2 Comparison of parameters among three groups of women (in subjects-1), divided according to the three *ADH2* genotypes. Right columns indicate *P*-value of statistical difference between each two group

| Variables | Women | | | <i>P</i> -value | | | |
|-----------------------|--------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | ADH genotype | 2/2 | 1/2 | 1/1 | 2/2 vs. 1/2 | 2/2 vs. 1/1 | 1/2 vs. 1/1 |
| Subjects-1 <i>n</i> = | | 666 | 381 | 59 | | | |
| Age (years) | | 59.4 ± 0.4 | 59.1 ± 0.6 | 60.0 ± 1.4 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Height (cm) | | 151.3 ± 0.2 | 151.1 ± 0.3 | 151.1 ± 0.8 | n.s. | n.s. | n.s. |
| BMI | | 23.0 ± 0.1 | 22.7 ± 0.2 | 23.1 ± 0.4 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Smoking (%) | | 93/7 | 93/7 | 92/8 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Alcohol (g/day) | | 5.2 ± 0.6 | 5.4 ± 0.8 | 6.4 ± 2.0 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Drinkers (%) | | 22.9 | 25.5 | 39.7 | <0.0166 | | |
| AST (IU/l) | | 24.5 ± 0.6 | 23.5 ± 0.7 | 23.3 ± 1.8 | n.s. | n.s. | n.s. |
| ALT (IU/l) | | 21.2 ± 0.8 | 20.1 ± 1.0 | 18.9 ± 2.5 | n.s. | n.s. | n.s. |
| γ-GTP (IU/l) | | 27.9 ± 1.1 | 28.5 ± 1.4 | 29.4 ± 3.6 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Diabetics (%) | | 9.16 | 10.5 | 6.78 | n.s. | n.s. | n.s. |

Drinkers 2/2 ± 1/2 vs. 1/1, *P* < 0.01

Next, we compared blood parameters of liver function, namely AST, ALT, and γ-GTP activities. In men, levels were significantly higher in the *ADH2**1/1 group than the other two *ADH2* groups (Table 1, AST; *P* < 0.01 in *ADH2**2/2 vs. *ADH2**1/1 and *P* < 0.01 in *ADH2**1/2 vs. *ADH2**1/1. ALT; *P* < 0.05 in *ADH2**2/2 vs. *ADH2**1/1 and *P* < 0.05 in *ADH2**1/2 vs. *ADH2**1/1. γ-GTP; *P* < 0.05 in *ADH2**2/2 vs. *ADH2**1/1 and *P* < 0.05 in *ADH2**1/2 vs. *ADH2**1/1), indicating that more alcohol intake in the *ADH2**1/1 group causes damage to the liver. On the other hand, no significant difference was found in women (Table 2); nevertheless the *ADH2**1/1 group consumed more alcohol than the other groups, probably because women drink less than men.

In subjects-1, the percentage of those with diabetes was compared among the three *ADH2* genotypic groups. However, there was no statistical difference in the prevalence of diabetes among the three groups (men; *ADH2**2/2:13.3%, *ADH2**1/2:13.3%, and *ADH2**1/1:13.6%, women; *ADH2**2/2:9.2%, *ADH2**1/2:10.5%, and *ADH2**1/1:6.8%, total subjects-1;

*ADH2**2/2:11.2%, *ADH2**1/2:11.9%, and *ADH2**1/1:10.2%) (Tables 1, 2, 3).

Influence of *ADH2* genotype on fasting insulin concentration

We tried to clarify the correlation of insulin concentration with *ADH2* genotype. To exclude the effect of medication, subjects were limited to those (subjects-2) not treated with insulin therapy and/or with oral medications for diabetes. Although habits or behaviors generally depend upon genetic factors, we would like to distinguish the genetic effects from the secondary results of alcohol consumption. Since the frequency of drinking and the amount of alcohol consumed were the same in the *ADH2**1/2 and *ADH2**2/2 groups (Fig. 1 and Tables 1, 2, 3), we compared fasting insulin concentrations between these two groups. Insulin levels were lower in the *ADH2**1/2 than *ADH2**2/2 group in total subjects-2 (*P* < 0.02). In men, insulin levels were lower in the *ADH2**1/2 than *ADH2**2/2 group (*P* < 0.05), while in

Table 3 Comparison of parameters among three groups of total subjects-1 divided according to *ADH2* genotype. Right columns indicate *P*-values of statistical differences between two groups

| Variables | Total (men + women) | | | <i>P</i> -value | | | |
|-----------------------|---------------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | ADH genotype | 2/2 | 1/2 | 1/1 | 2/2 vs. 1/2 | 2/2 vs. 1/1 | 1/2 vs. 1/1 |
| Subjects-1 <i>n</i> = | | 1,352 | 756 | 118 | | | |
| Age (years) | | 59.4 ± 0.3 | 59.0 ± 0.4 | 59.0 ± 1.0 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Height (cm) | | 158.2 ± 0.2 | 158.1 ± 0.3 | 156.8 ± 0.8 | n.s. | n.s. | n.s. |
| BMI | | 23.0 ± 0.1 | 22.7 ± 0.1 | 23.1 ± 0.3 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Smoking (%) | | 77/23 | 78/22 | 78/22 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Alcohol (g/day) | | 17.2 ± 0.9 | 17.6 ± 1.1 | 24.9 ± 2.8 | n.s. | 0.0089** | 0.0158** |
| Drinkers (%) | | 45.4 | 45.6 | 62.0 | <0.0033 | | |
| AST (IU/l) | | 25.6 ± 0.4 | 25.0 ± 0.6 | 28.3 ± 1.4 | n.s. | n.s. | 0.0383** |
| ALT (IU/l) | | 24.2 ± 0.6 | 23.4 ± 0.8 | 26.5 ± 2.0 | n.s. | n.s. | n.s. |
| γ-GTP (IU/l) | | 43.3 ± 1.7 | 42.9 ± 2.3 | 54.4 ± 5.7 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Diabetics (%) | | 11.2% | 11.9% | 10.2% | n.s. | n.s. | n.s. |

Drinkers 2/2 ± 1/2 vs. 1/1, *P* < 0.001; alcohol 2/2 ± 1/2 vs. 1/1, *P* < 0.01

* *P* < 0.05

** *P* < 0.01

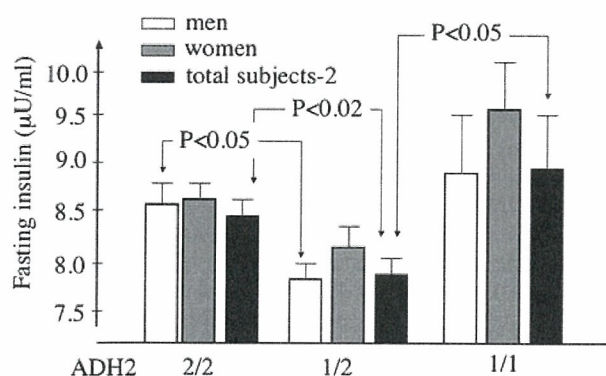


Fig. 2 Correlation of *ADH2* genotype with fasting insulin concentration in subject-2 group. Fasting insulin concentration ($\mu\text{U/ml}$): a significant difference was found between *ADH2**2/2 and *ADH2**1/2 in men (8.56 ± 0.24 vs. 7.77 ± 0.32 , $P < 0.05$), and between *ADH2**2/2 and *ADH2**1/2 in total subjects-2 (8.44 ± 0.15 vs. 7.84 ± 0.20 , $P < 0.02$). A significant difference was found between *ADH2**1/2 and *ADH2**1/1 in total subjects-2 (7.84 ± 0.20 vs. 8.92 ± 0.50 , $P < 0.05$)

women, the *ADH2**1/2 group tended to have lower insulin concentrations (Fig. 2 and Table 4). This suggests that the *ADH2**1 allele has a lowering effect on the concentration of insulin.

Next, we compared the concentration of insulin between *ADH2**1/2 and *ADH2**1/1. The concentration tended to be higher in the *ADH2**1/1 group than the *ADH2**1/2 group in men, women and total subjects-2, but a significant difference was only found in total subjects-2 (insulin, *ADH2**1/2: 7.84 ± 0.20 $\mu\text{U/ml}$, *ADH2**1/1: 8.92 ± 0.50 $\mu\text{U/ml}$, $P < 0.05$, Table 3 and Fig. 2). Because the *ADH2**1/1 group is small, the difference may have become statistically insignificant in men or in women.

In subjects-2, while the difference was statistically insignificant, the average level of HbA1c tended to be lower in the *ADH2**1/2 group than the *ADH2**1/1 or *ADH2**2/2 group (Fig. 3 and Table 4). For instance, in

total subjects-2, HbA1c was $5.20 \pm 0.02\%$, $5.17 \pm 0.02\%$, and $5.23 \pm 0.05\%$, respectively, in the *ADH2**2/2, *ADH2**1/2, and *ADH2**1/1 groups. Therefore, low insulin levels in the *ADH2**1/2 group seem to parallel low HbA1c levels, showing a U-shaped relationship with *ADH2* genotype as in Figs. 2 and 3.

Discussion

By examining the correlation between *ADH2* genotype and drinking behavior, we confirmed the previous observation that *ADH2* genotype influences the amount of alcohol consumed in a Japanese population (Higuchi et al 1996). In addition to alcohol consumption and percentage of drinkers, men from the *ADH2**1/1 group had the highest levels of AST, ALT, and γ -GTP, suggesting that they drink so much alcohol that their livers become damaged. This coincides with the observation of Tanaka et al (1996), supporting the idea that *ADH2* polymorphisms play an important role in alcoholic liver diseases.

In terms of the mechanism involved, since carriers of *ADH2**1/1 have less enzymatic activity for ethanol than carriers of *ADH2**2/1 or *ADH2**2/2, the slow rate of ethanol clearance could damage the liver, but this is unlikely because ethanol is less toxic than acetaldehyde. Alternatively, it is possible that the slow rate of ethanol clearance protects the subjects from the uncomfortable feeling caused by acetaldehyde, thereby causing them to drink too much alcohol and leading to liver damage.

Interestingly, concentrations of insulin were higher in the *ADH2**1/1 than the *ADH2**1/2 group. Onishi et al (2003) reported that excess alcohol intake can induce insulin resistance with enhanced PI3-kinase activation. Therefore, in the *ADH2**1/1 group, excess alcohol intake may cause insulin resistance, resulting in hyperinsulinemia. Otherwise, some liver dysfunction caused by excess alcohol intake may cause a high glucose output from liver, thereby inducing hyperinsulinemia.

Table 4 Comparison of glucose–insulin axis parameters among three groups of subjects-2 divided according to the three *ADH2* genotypes

| Variables | | | | P-value | | | |
|------------------------------|--------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| | ADH genotype | 2/2 | 1/2 | 1/1 | 2/2 vs. 1/2 | 2/2 vs. 1/1 | 1/2 vs. 1/1 |
| Men n = | | 640 | 346 | 57 | | | |
| FPG (mg/dl) | | 103.3 \pm 0.7 | 102.6 \pm 0.9 | 103.3 \pm 2.2 | n.s. | n.s. | n.s. |
| HbA1c (%) | | 5.24 \pm 0.02 | 5.22 \pm 0.03 | 5.27 \pm 0.08 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Insulin ($\mu\text{U/ml}$) | | 8.46 \pm 0.22 | 7.69 \pm 0.31 | 8.47 \pm 0.75 | 0.0452* | n.s. | n.s. |
| Women n = | | 623 | 354 | 57 | | | |
| FPG (mg/dl) | | 98.6 \pm 0.6 | 99.3 \pm 0.8 | 99.2 \pm 2.1 | n.s. | n.s. | n.s. |
| HbA1c (%) | | 5.15 \pm 0.02 | 5.11 \pm 0.03 | 5.17 \pm 0.06 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Insulin ($\mu\text{U/ml}$) | | 8.42 \pm 0.19 | 8.00 \pm 0.26 | 9.36 \pm 0.65 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Total n = | | 1,263 | 700 | 114 | | | |
| FPG (mg/dl) | | 101.0 \pm 0.46 | 101.0 \pm 0.6 | 101.2 \pm 1.5 | n.s. | n.s. | n.s. |
| HbA1c (%) | | 5.20 \pm 0.02 | 5.17 \pm 0.02 | 5.23 \pm 0.05 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Insulin ($\mu\text{U/ml}$) | | 8.44 \pm 0.15 | 7.84 \pm 0.20 | 8.92 \pm 0.50 | 0.018* | n.s. | 0.045* |

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

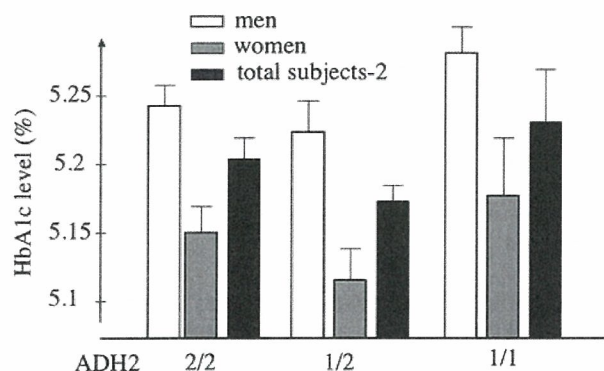


Fig. 3 Correlation of *ADH2* genotype with HbA1c level in subject-2. A significant difference was not found between the three groups. However, the HbA1c level showed a U-shaped relationship as if correlated to the insulin level

Next, we tried to focus on the *ADH2*'s genetic effects on the insulin–glucose axis. Because alcohol produces complicated effects, it is generally difficult to distinguish the genetic effects from the influence of alcohol drinking behavior. Interestingly, alcohol consumption or percentage of drinkers did not differ between the *ADH2**1/2 and *ADH2**2/2 groups (Tables 1, 2, 3 and Fig. 1a, b). This enabled us to compare the insulin concentration, dependent upon the difference in *ADH2* activity itself, based on the *ADH2* polymorphism, almost independently from alcohol intake. Among subjects-2, we found that fasting insulin concentrations were significantly lower in the men and total subjects-2 with the *ADH2**1/2 genotype than those with the *ADH2**2/2 genotype (Table 4 and Fig. 2). A similar trend was seen in women, suggesting that this trend is reproducible irrespective of gender.

Thus, this study suggests that *ADH2**1 has a biphasic effect on the insulin concentration, a lowering effect with *ADH2**1/2, and a raising effect with *ADH2**1/1 on excess alcohol intake. Interestingly, the average levels of HbA1c in subjects-2 tended to be lower in the *ADH2**1/2 group than the *ADH2**1/1 or *ADH2**2/2 groups. These two parameters seem to exhibit a U-shaped relationship (Figs. 2, 3). In nondiabetic subjects, a low insulin concentration together with a low HbA1c level usually coincides with low insulin resistance. Therefore, the above relationship suggests that light-to-moderate drinkers with the *ADH2**1 allele are likely to have reduced insulin resistance. Interestingly, this coincides with numerous other observations (Conigrave et al 2001; Hu et al 2001; Tsumura et al 1999) in terms of the notion that light drinking could benefit glucose tolerance.

Alcohol dehydrogenase catalyzed the first step in the metabolism of ethanol but has a wide range of substrates, including both aliphatic and aromatic alcohols, aldehydes, sterols, and ω -hydroxy fatty acids. We previously reported that, in the same population study, the *ADH2**1 allele is associated with increased levels of

LDL-cholesterol and high blood pressure, and an increased risk of cerebral infarction (Suzuki et al 2004). The concentration of insulin or resistance to insulin could be affected by sex hormones, sex hormone-binding globulin or obesity (Falkner et al 1999; Collison et al 2000). Therefore, as another possibility, the interaction of the *ADH2**1 allele with several hormones associated with sex or lipids may decrease the insulin resistance in target tissues (Harada et al 1998).

However, in this study, the prevalence of diabetes did not differ among the three *ADH2* genotypes in subjects-1. Therefore, the effect of *ADH2* genotype on insulin resistance may be so mild or complex that it did not influence the prevalence of diabetes in the community-dwelling Japanese population. Alternatively, since all of the subjects whose FPG levels were higher than 110 mg/dl were not confirmed by the oral glucose tolerance test, if the subjects who had postprandial hyperglycemia had been included in subject-1, the result could have been different. To clarify this, a further study will be needed.

It is well known that drinking behavior is influenced more by *ALDH2* (aldehyde dehydrogenase 2) genotype than *ADH2* genotype (Higuchi et al 1996). However, although a similar investigation was performed on the correlation between *ALDH2* genotypes and their phenotype, no genetic effect of *ALDH2* was found in insulin–glucose axis and liver dysfunction (Ohsawa et al 2003). Thus, amounts of alcohol consumed would not simply depend upon insulin level.

In conclusion, this is the first paper to propose an effect of *ADH2* genotype on insulin concentrations in the Japanese. The effect seems small, although it was statistically significant due to the large number of subjects. The effect is possibly too small to have a significant bearing on the prevalence of diabetes. However, this finding provides several insights into the complex relationship between alcohol metabolism, genetic background, change in alcohol drinking behavior, the insulin–glucose axis, and the prevalence of diabetes and liver dysfunction.

References

- Borson WE, Lumeng L, Li TK (1988) Genetic polymorphism of enzymes of alcohol metabolism and susceptibility to alcoholic liver disease. *Mol Aspects Med* 10:147–158
- Collison M, Campbell IW, Salt IP et al (2000) Sex hormones induce insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by reducing cellular content of IRS proteins. *Diabetologia* 43:1374–1380
- Conigrave KM, Hu BF, Camargo CA et al (2001) A prospective study of drinking patterns in relation to risk of type 2 diabetes among men. *Diabetes* 50:2390–2395
- Falkner B, Sherif K, Sumner A et al (1999) Hyperinsulinism and sex hormones in young adult African Americans. *Metabolism* 48:107–112
- Harada S, Tachiyashiki K, Imaizumi K (1998) Effect of sex hormones on rat liver cytosolic alcohol dehydrogenase activity. *J Nutr Sci Vitaminol* 44:625–639
- Higuchi S, Matsushita S, Muramatsu T et al (1996) Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and drinking behavior in Japanese. *Alcohol Clin Exp Res* 20:493–497