

ミトコンドリア遺伝子変異の蓄積と老化

田中 雅嗣*

岐阜県国際バイオ研究所遺伝子治療研究部 〒505-0116 岐阜県可児郡御嵩町八木記念パーク

Mitochondrial DNA polymorphisms and aging

Masashi Tanaka

Gifu International Institute of Biotechnology

Summary

All of the genes in mitochondrial DNA (mtDNA) are fully expressed in cells, whereas only 1.5 % of the nuclear DNA (nDNA) is functionally expressed. Assuming that the copy number of mtDNA is 2000 per cell, the total functioning mtDNA is 3×10^7 bp, which is 1/3 of the functioning nDNA. Because the evolutionary rate of mtDNA is 5-10 times higher than that of nDNA, the functional significance of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in mtDNA is comparable to those in nDNA. Thus, SNPs in mtDNA are expected to influence the susceptibility of individuals to various diseases in combination with SNPs in nDNA.

First, we analyzed synonymous mutations in mtDNA to understand the mutational mechanisms. Replication of mtDNA is highly asymmetric between the heavy (H) and light (L) strands. The parental H strand is displaced by the daughter H strand and remains in a single-stranded state until the daughter L strand is synthesized. Occurrence of nucleotide substitutions was distinctly asymmetric between the two strands; G → A and T → C transitions were 9-fold and 1.8-fold more frequent on the L strand than on the H strand, respectively. This nucleotide substitution bias is consistent with the T- and G-abundance of the H strand as well as the A- and C-abundance of the L strand. Deamination of cytosine to uracil or adenine to hypoxanthine in the single-stranded state of the parental H strand seems to contribute to the mutagenesis in mtDNA.

Second, we examined the effect of mitochondrial genotypes on the predisposition to longevity or various diseases. Mt5178A, causing a Leu → Met replacement in the ND2 gene, was more frequently observed in centenarians than in controls. The longevity-associated genotype Mt5178A predisposes resistance to adult-onset diseases. We have confirmed that Mt5178A exhibits an anti-arteriosclerotic effect at least in diabetic patients. Genotyping of patients with mitochondrial diseases has revealed that the Mt5178A genotype suppresses the occurrence of mtDNA mutations, especially the Mt8993 T → G transversion. Because T → G transversion can be induced by oxidative damage to DNA, the difference in the occurrence of this mutation may be relevant to the functional differences between genotypes Mt5178A and Mt5178C. We can also speculate that the rates of age-associated accumulation of mitochondrial mutations in somatic cells are different between these mitochondrial genotypes.

Keywords : mitochondrial DNA, deamination, uracil, hypoxanthine, longevity

緒 言

加齢に伴って癌や成人発症性疾患あるいは生活習慣病の頻度が上昇する。これらの発症に関して、動脈硬化など血管病変の形成における脂質過酸化反応、発癌過程に

* mtanaka@giib.or.jp

受付：2001年11月17日 受理：2001年11月17日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。

This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

おける活性酸素種 (reactive oxygen species) による核 DNA の酸化損傷などが注目されている。ミトコンドリアは活性酸素種および過酸化脂質の細胞内における主要な産生場である。体重あたりの代謝速度が大きい動物ほど寿命が短いことは、ミトコンドリアにおける呼吸が活発であれば、それによる酸化損傷が増大し、細胞老化が促進されることを示唆する。ミトコンドリア DNA (mtDNA) の進化速度は大きく、アミノ酸配列も種間で大きく異なる。アミノ酸配列の種差の一部はミトコンドリアの呼吸速度に適応したものであろう。本稿では第1に mtDNA の同義置換の分析結果に基づいて mtDNA の変異発生機構について論じる。第2にヒトの種内変異であるミトコンドリア遺伝子多型が、個体間のミトコンドリア機能の多様性に関与し、ひいては成人発症性疾患に対する感受性に影響を与えているとの仮説に基づき、長寿者群と疾患群のミトコンドリア遺伝子型を比較した結果について紹介する。長寿に関連する遺伝子多型 Mt5178A の抗動脈硬化作用ならびに mtDNA 変異発生抑制効果についても報告したい。

1. ミトコンドリア DNA における多型および変異の発生機構

1) ミトコンドリアゲノムの単塩基置換多型の機能的な重要性

ミトコンドリアゲノムは 16,569 塩基からなる環状二重鎖 DNA であり、2 種のリボソーム RNA、22 種のトランスファー RNA、13 種のメッセンジャー RNA をコードしている (Anderson et al., 1981)。これらによって、ミトコンドリア内において、酸化リン酸化系の複合体 I-V の 13 種のサブユニットが合成される。

ミトコンドリアは酸素を利用して ATP を合成する。筋細胞ではその断面積の 33% を占め、神経細胞においても重要な役割を果たしている。mtDNA は母性遺伝し、活性酸素の主要な発生源であるミトコンドリア内にあるため、老化や各種の病態において mtDNA の変異が蓄積することが明らかになっている。またアポトーシスの過程や高血糖時の内皮細胞傷害にミトコンドリアが関与していることが注目されている。

一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) が注目されており、我が国では標準 SNP データベースの整備が進められている。著者らは、ミレニアムプロジェクトの一環として、各 96 例からなる 6 群 (百寿者・パーキンソン病患者・一般糖尿病患者・血管病変を伴う糖尿病患者・若年肥満者・若年非肥満者)、合計 576 例のミトコンドリアゲノムの全塩基配列 (2000 万塩基対) を決定し、長寿あるいは疾患に関連する新規の遺伝子多型を探索する計画を進めている。これは科学技術振興事業団のデータベース構築支援事業に基づくものであり、平成 15 年春に公開される予定である。これによって日

本人のミトコンドリアゲノムにおける SNPs の全貌が明らかになる。

核 DNA は、30 億塩基対のゲノムが 2 対あるので 60 億塩基対である。核のゲノムには 2 万 6 千～4 万個の遺伝子があり、その機能している部分は 9000 万塩基対 (1.5%) である。一方、mDNA (1.5 万塩基対) では 37 個の遺伝子 (2 rRNA, 22 tRNA, 13 mRNA) が機能しているが、1 個の細胞あたり 2000 コピー存在するので、細胞あたり 3000 万塩基対が機能していることになる。従って mDNA の機能部分は核 DNA の機能部分の 1/3 となる。ここで、mtDNA の進化速度が核 DNA より 5～10 倍高いことを考慮すると mtDNA の SNPs は機能的な重要度において核 DNA の SNPs を凌駕するといえる (Tanaka et al., 2000)。

2) ミトコンドリアのコドン表と塩基置換の発生状況

mtDNA の変異発生機構を論じる前に、mtDNA のコドン表の特徴についてまとめよう。まず、ミトコンドリアの tRNA は 22 種類であり、重複は 2 組ある。Leu には CUN (N = A/C/G/U) と UUR (R = A/G) に対応する tRNA があり、Ser にも UCN と AGY (Y = C/U) に対応する tRNA がある。普遍コドン表では AGR はアルギニンをコードしているが、ミトコンドリアのコドン表では AGR は終止コドンとなっており、GCN のみが Arg をコードしている。注目すべきは、コドン第 3 部位の transition が全て同義置換となることである。普遍コドン表では UGA は終止コドンになるが、ミトコンドリアのコドン表では UGR (UGA と UGG) の両方が Trp をコードしている。また、普遍コドン表では AUA は Ile をコードしているが、ミトコンドリアのコドン表では AUR (AUA と AUG の両方) が Met をコードしている。これらによって A ⇌ G transition が生じても Trp と Met を安定して使用することができる。

43 例の mtDNA (16,565 塩基対)、合計 712,467 塩基対の分析結果に基づいて 13 種のサブユニット遺伝子 (11,320 塩基対) を分析すると、合計 295 個の塩基置換 (295/11320 = 2.9%) が見出された。そのうち、同義置換は 194 個 (66%) であったが、非同義置換も 101 個 (34%) 存在した (Tanaka and Ozawa, 1994)。

3) H 鎖と L 鎖の間における非対称的な塩基置換の発生

まず、mtDNA の同義置換の特徴について述べる。同義置換のうち、Arg をコードするコドン GCN の第 3 位置のようにどの塩基に置換が生じてもアミノ酸置換を生じない部位 (4 重縮退部位) における塩基置換に注目した。著者らは 43 例の個体の mtDNA の全塩基配列の解析結果に基づいて 4 重縮退部位における変異発生頻度を計算し、種内変異の発生機構を探った (Tanaka and Ozawa, 1994)。

mtDNAの二本の鎖はlight strand (L鎖) と heavy-strand (H鎖) からなる。L鎖はCとAの含量が高く、GとTの含量が低い。一方、H鎖はGとTの含量が高く、CとAの含量が低い。

L鎖の4重縮退部位におけるG→A transitionの頻度は20/97 (20.6%) であるのに対し、A→G transitionの頻度は24/771 (3.1%) であった。またT→C transitionの

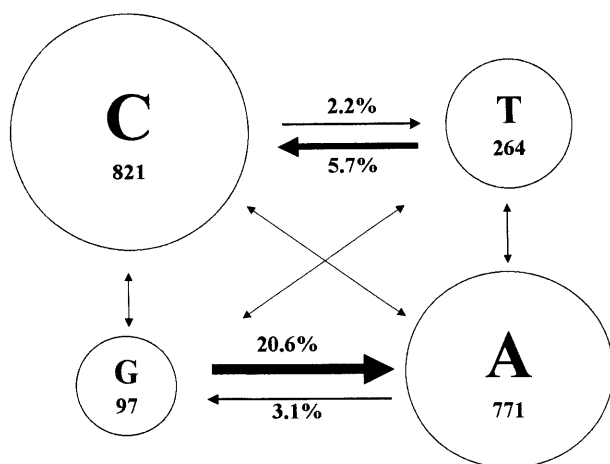


Fig. 1 Frequency of nucleotide substitutions in the fourfold degenerate sites within the heavy-strand encoded genes of human mtDNA. Number of nucleotides at the fourfold degenerate sites is shown in each circle. The arrows and percentages show directions and frequencies of substitutions.

頻度は15/264 (5.7%) であるのに対し、C→T transitionの頻度は18/821 (2.2%) であった。A→GよりG→Aの頻度が高いために、Gが少数となりAが多数になる。同様にC→TよりT→Cの頻度が高いために、Tが少数となりCが多数になる。このように、4重縮退部位における塩基の頻度が変異発生頻度の逆数に比例すると仮定して計算すると、予測値と観測値はよく一致した。

L鎖においてG→A transitionの頻度がC→T transitionの頻度より高いことは、G→A transitionの頻度がH鎖よりもL鎖において高いことを意味する。同様にL鎖においてT→C transitionの頻度がA→G transitionの頻度より高いことは、T→C transitionの頻度がH鎖よりもL鎖において高いことを意味する。このようにH鎖とL鎖の間で、変異が非対称的に生じることは、mtDNAの複製の特殊性に関連がある。

4) MtDNAの複製機構

Fig. 2にMtDNAの複製機構を示した (Clayton, 1982)。MtDNAのH鎖の複製は、D-loopにあるH鎖の複製開始点 (Ori_H) から始まる。親H鎖を押しのけながら、娘H鎖の合成が進む。娘H鎖の合成が8時の位置まで進み、親H鎖の上にあるL鎖の複製開始点 (Ori_L) が現れると、初めて娘L鎖の複製が始まる。この間に親H鎖は一本鎖状態におかれる。MtDNAの複製は緩徐であり、約2時間かかるとされている。これは、mtDNAの複製が行われるマトリックス空間は蛋白質の密度が高く、速やかな

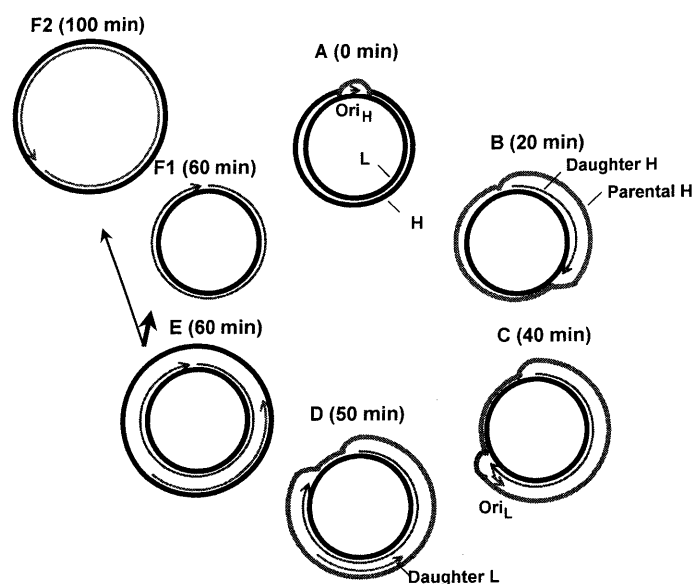


Fig. 2 Replication of mitochondrial genome. Replication of the daughter heavy (H) strand starts from the origin of H strand replication (Ori_H) within the major non-coding region (Step A at 0 min). The author assumes that it takes 60 min for the replication of H strand to be completed. The replication of the daughter light (L) strand starts at 40 min (Step C) from the origin of L strand replication (Ori_L) and ends at 100 min (Step F2). The duration of single-stranded state of the parental H strand near the non-coding region is 40 + 40 = 80 min. Deamination of cytosine to uracil or adenine to hypoxanthine on the parental H strand is highly mutagenic.

Table 1 Comparison of nucleotides at fourfold degenerate sites where A-to-G transition was detected at least one individual among 43 individuals

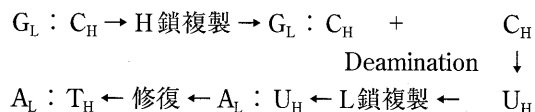
Nuc	Gene	Sia	Ora	Gor	Pyg	Chi	Hum	Mut	Obs	Anal	Occur
4715	ND2	A	A	A	A	A	A	G	1	43	once
4961	ND2	A	A	A	A	A	A	G	1	43	once
5240	ND2	A	A	A	A	A	A	G	1	43	once
7055	CO1	A	A	A	A	A	A	G	1	43	once
7403	CO1	A	A	A	A	A	A	G	1	43	once
8071	CO2	A	A	A	A	A	A	G	2	43	twice
7250	CO1	C	A	A	A	A	A	G	1	43	once
5351	ND2	A	A	A	C	A	A	G	2	43	once
5441	ND2	T	T	C	C	C	A	G	1	43	once
7828	CO2	C	A	A	A	G	A	G	1	43	once

Abbreviations used are : Nuc, nucleotide position ; Sia, Siamang, *Symphalangus syndactylus* ; Ora, orangutan ; Gor, gorilla ; Pyg, pygmy chimpanzee ; Chim, chimpanzee ; Hum, standard nucleotide in human ; Mut, mutated nucleotide detected at least in one individual ; Obs, number of individuals with the substitution ; Anal, number of individuals analyzed ; and Occur, number of mutational occurrence in the phylogenetic tree.

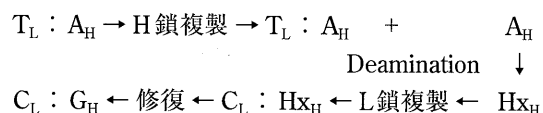
DNAの合成ができないためと推定されている。親H鎖には一本鎖DNA結合蛋白質 (single strand binding protein, SSB) が結合して安定化されるとはいえ、一本鎖DNAは二本鎖DNAよりもDNA損傷が生じやすい。損傷された親H鎖を鋳型として合成される娘L鎖の複製の過程において変異が発生する。

5) MtDNAにおける transition の発生機構

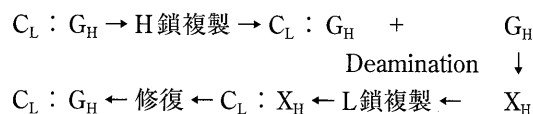
G → A transition の発生機構をここに示す。母H鎖上でCからUへ脱アミノ反応が起こる。母H鎖上に生じたUを鋳型として娘L鎖が合成されるときAが取り込まれる。この結果L鎖上でG → A transition が生じる。変異原性のあるUを排除するために、uracil DNA-glycosylaseが存在するが、Gと対をなしているUを除去する場合のみに有効である。一本鎖状態においてCがUに転換し、それを鋳型としてAが取り込まれた場合には、uracil DNA-glycosylaseが作用してもUがTに置き換えられるのみである。



同様にT → C transition の発生機構も母H鎖上のAの脱アミノで説明できる。母H鎖上でAからhypoxanthine (Hx) へ脱アミノ反応が起こる。HxはTではなくCと対合するので、その結果としてT → C transition を生じる。変異原性のあるHxを排除するために、hypoxanthine DNA-glycosylaseが存在するが、Tと対をなしているHxを除去する場合のみに有効である。一本鎖状態においてAがHxに転換し、それを鋳型としてCが取り込まれた場合には、hypoxanthine DNA-glycosylaseが作用してもHxがGに置き換えられるのみである。



これに対し母H鎖上でGからxanthine (X) へ脱アミノ反応が起きても、Xには変異原性がない。これはXがCと対合するためである。従って、L鎖上のCは安定であり、このため頻度が高い。



Ori_Lに近いcytochrome c oxidaseの遺伝子COIおよびCOII遺伝子では、親H鎖は一本鎖状態におかれる時間が短いために、これらの遺伝子領域では変異発生頻度が低いと予想される。一方、Ori_Lから遠いcytochrome bのCytb遺伝子では、親H鎖は一本鎖状態におかれる時間が長いために、この遺伝子領域では変異発生頻度が高いと予想される。4重縮退部位におけるGの含量はOri_Lから距離に関わらず全般的に低いが、Ori_Lから遠い遺伝子ほど4重縮退部位におけるTの含量が低くなっている。しかしながら、実際にOri_Lから距離によって遺伝子間で発生頻度が異なるかどうかを実証するために、さらに多数の個体を用いて種内変異を解析している。

6) 種内変異と種間変異の比較

次に、人類の種内変異 (intraspecific mutation) の解析から得られたG → A transition の頻度がA → G transition の頻度よりも高いという結果が、霊長類の種間比較によって支持されるか否かを検討した。

Table 1に、43個体の中で、1個体以上において、A → G transition が検出された4重縮退部位において、5種の霊長類、すなわちシャーマン、オランウータン、ゴリラ、

Table 2 Comparison of nucleotides at fourfold degenerate sites where G-to-A transition was detected at least one individual among 43 individuals

Nuc	Gene	Sia	Ora	Gor	Pyg	Chi	Hum	Mut	Obs	Anal	Occur
4655	ND2	A	A	A	A	A	G	A	2	43	once
5147	ND2	A	A	A	A	A	G	A	2	43	once
6962	CO1	A	A	A	A	A	G	A	4	43	twice
8020	CO2	A	A	A	A	A	G	A	3	43	once
8155	CO2	A	A	A	A	A	G	A	1	43	once
8856	ATP6	A	A	A	A	A	G	A	2	43	twice
5231	ND2	A	G	A	A	A	G	A	2	43	once
8251	CO2	G	A	A	A	A	G	A	1	43	once
7600	CO2	T	A	G	G	G	G	A	2	43	once

Abbreviations used are the same as in Table 1.

ピグミーチンパンジー、チンパンジーで対応する位置にどのような塩基が見出されるかを比較したものである。5441番および7828番のAを除いて、多くの種においてAが観察されている。人類の共通の祖先（いわゆるミトコンドリアイブ）が持っていたA塩基のほとんどは霊長類と共通である。このことは霊長類の共通の祖先から、長期間にわたってAが保存されていたことを意味する。少数のヒト個体においてAからGへ新変異が生じたと考えられる。

Table 2は、43個体の中で、1個体以上において、G→A transitionが検出された4重縮退部位において、5種の霊長類で対応する位置にどのような塩基が見出されるかを比較したものである。7600番のGを除いて、多くの種において、また、ヒトに近縁のピグミーチンパンジーおよびチンパンジーにおいて、Aが観察されている。また系統樹を描くと6962G→Aと8856G→Aが2つの系統で独立に2回生じたことが分かっている。これらの比較から、ヒトとチンパンジーの共通の祖先から、ヒトの祖先が分岐した時にその祖先が偶然保有していたG変異が多くの人に伝達されていると考えられる。すなわち、ミトコンドリアイブが有していたGは新変異であったと考えられる。そのGは、少数の個人においてGからAに先祖帰りしている。近縁の種の塩基と比較すると、Gは一瞬出現し、急速に消滅していくようである。

2. 長寿とミトコンドリアDNA多型

1) 人類の歴史と儉約遺伝子型

ヒトは長い後生殖期を持つが、これは生物としては想定外である。後生殖期に発症する疾患は、次世代へ遺伝子が既に伝達された後に発症するので、これらの疾患に関連する遺伝子変異は選別されず、ヒト集団の中に多型として蓄積しうることを示している。人類の歴史の中で、飢餓や寒冷に適応した遺伝子型（儉約遺伝子型 *thrifty genotype*）が選択され、これが現代社会においては肥満し易い遺伝的体質をもたらしている可能性がある。ミトコンドリアのエネルギー産生系の特性がmtDNAの儉約

遺伝子型によって規定されているかどうかについては、検証が進んでいない。

2) 老化に関するミトコンドリア仮説

ミトコンドリア脳筋症、心筋症、糖尿病においてミトコンドリアDNA (mtDNA) の多様な変異が報告されている。病的変異によってミトコンドリア機能障害が生じると、ミトコンドリアからの活性酸素種の漏出が増大する (Zhang et al., 1998)。その結果、mtDNA自身の酸化損傷による二次的変異の発生が起きること (Kovalenko et al., 1996)、脂質過酸化反応の副産物である4ヒドロキシノネナールなどによって修飾された蛋白質 (Yoritaka et al., 1996) が主としてミトコンドリアにおいて増加することなどが明らかになった。

これらの疾患の病因となる変異に関する知見を、加齢に伴うミトコンドリア機能障害に外挿したものが、老化に関するミトコンドリア仮説である。著者らは体細胞におけるmtDNA変異の蓄積が加齢と変性疾患に関与していることを1989年に提唱した (Linnane et al., 1989)。この仮説を検証した結果、多様な病態においてmtDNAの欠失 (Hattori et al., 1991; Ikebe et al., 1990) あるいは点変異 (Kovalenko et al., 1996) が蓄積することをPCR法あるいはin situ hybridization (Nakamura et al., 1996) によって示すことができた。

mtDNAの進化速度は核DNAの進化速度の5～10倍高く、mtDNAの塩基配列の多様性は個体間で顕著である。ミトコンドリアが老化において重要な役割を演じていることを明示するためには、mtDNA多型の相違によってミトコンドリアからのラジカル産生量が異なり、その結果、成人発症性疾患に罹患する危険率が変化し、ひいては寿命にも影響を及ぼすという仮説を検証する必要がある。著者らは現在、多様なミトコンドリア遺伝子多型を解析し、それらの多型の老化過程への影響、あるいは生活習慣病に罹患するリスクファクターとしての意義を解明しようとしている。

Table 3 Nucleotide substitutions detected frequently in Japanese centenarians

Substitution	Gene	Amino acid replacement	Centenarian	Control
5178C→A	ND2	Leu237Met	9/11	12/43
8414C→T	ATP8	Leu17Phe	7/11	11/43
3010G→A	16S rRNA	—	7/11	11/42

3) 長寿に関連するミトコンドリアゲノムの一塩基多型

ミトコンドリアゲノムはSangerらが1981年に全塩基配列を決定しており、ヒトゲノム計画のさきがけである。著者らは、パーキンソン病あるいは特発性心筋症の患者についてmtDNAの全塩基配列の決定を行った。それぞれの患者で見出された塩基置換が、病態に関与していることを証明するためには、疾患群でのSNPの頻度と正常者での頻度を比較する必要がある。しかし、中高年で発症する疾患について考えると正常者の定義が難しい。ほぼ同年齢の個体を対照群としても、数年後にその疾患を発症する可能性は否定できない。そこで長寿者の代表である百寿者（100歳以上）を疾患群に対峙するコントロール群として選択した。

4) 長寿と母性遺伝

冠動脈の異常に基づく心臓病に関する疫学的研究（Framingham study）によれば、長寿は父親の死亡年齢よりも母親の死亡年齢によって強い影響を受ける（Brand et al., 1992）。母性遺伝によって伝えられたミトコンドリア遺伝子型が、mtDNAに対する酸化的損傷、mtDNA変異の蓄積速度、変性疾患に対する罹り易さ、さらには個体の寿命に影響を及ぼしている可能性がある。この仮説を検証するために、著者らは37例の日本人の百寿者のmtDNAを分析した（Tanaka et al., 1998）。

5) 百寿者のミトコンドリア遺伝子の解析

はじめに、11例の百寿者においてmtDNAの全塩基配列を解析した。多様な塩基置換が存在したが、mtDNAの全塩基配列が既に決定されていた43例の対照群と比較して、これらの百寿者において数個の塩基置換がより高い頻度で検出された（Table 3）。

アミノ酸置換を伴う2カ所の塩基置換が百寿者群でより高い頻度で観察された。第1の塩基置換（Mt5178A）は、NADH脱水素酵素の第2サブユニットの遺伝子（ND2）領域内の塩基番号5178C→A transversionであり、Leu237Met置換を伴う。Mt5178Aは百寿者の11例中9例で検出されたのに対し、対照群では43例中12例にのみ検出された。この頻度の差は危険率0.01以下で統計学的に有意であった。

第2の塩基置換（Mt8414T）は、ATP合成酵素の第8サブユニットの遺伝子（ATP8）領域内の8414C→T transitionであり、Leu17Phe置換を伴う。Mt8414Tは百

寿者の11例中7例で検出されたのに対し、対照群では43例中11例にのみ検出された。この頻度の差は危険率0.05以下で有意であった。

さらに第3の塩基置換（Mt3010A）は16SリボソームRNA遺伝子領域内の3010G→A transitionである。Mt3010Aは百寿者の11例中7例で検出されたのに対し、対照群では42例中11例にのみ検出された。この頻度の差は危険率0.05以下で有意であった。

Mt8414TとMt3010Aの両者を有する百寿者7例は、Mt5178Aを有する百寿者9例に含まれていたもので、これらの塩基置換の大部分は連鎖していることが示唆された。

6) ミトコンドリア遺伝子型の頻度比較

これらの塩基置換の中からMt5178Aに注目し、PCR-RFLP法によって、37例の百寿者と252例の愛知県内の健康な献血者の試料をスクリーニングした。Mt5178Aの百寿者における頻度（23/37, 62%）は、献血者における頻度（114/252, 45%）より統計学的に有意に高かった（危険率0.04, オッズ比=1.99）。このことはMt5178Aが長寿に関連していることを示唆している。

これらのmtDNAの塩基置換が疾患の発生に及ぼす影響を評価するために、Mt5178AとMt5178Cの頻度を、無作為抽出した大学病院の入院患者および外来患者338例において調べた。Mt5178AまたはMt5178Cを有する患者の年齢分布から、若い患者におけるMt5178Cの頻度はMt5178Aの頻度とほぼ等しかったのに対し（46歳未満の患者でのMt5178 A : C 比 46 : 40）、高齢の患者におけるMt5178Cの頻度はMt5178Aの頻度と比較してより顕著な増加を示し（46歳以上の患者でのMt5178 A : C 比 86 : 166）、46歳において明瞭な屈折点を示すことが明らかになった。高齢の患者におけるMt5178 A/C 比（86 : 166）は、百寿者における比（23 : 14, $p=0.001$ ）および健常人対照における比（114 : 138, $p=0.01$ ）と比較して統計学的に有意に低かった。この結果はMt5178Cを有する個体が、Mt5178Aを有する個体と比較して、成人発症性の疾患に罹患しやすいことを示唆している。

7) ミトコンドリア遺伝子型間の機能的相違

ミトコンドリア遺伝子型の相違によって呼吸活性・活性酸素種の発生量に相違があるか否かを明らかにするた

めに、新生児の臍帯血から血小板を単離し、骨肉腫由来の ρ^0 細胞と融合し、Mt5178AあるいはMt5178C型のミトコンドリアを有する細胞株を多数確立した。しかしながら、細胞株間の呼吸活性あるいは活性酸素種の発生量の分散が大きいと、遺伝子型間で有意な差を示すことはできなかった。

Mt5178C→Aによってアミノ酸置換が生じる残基Leu237は哺乳類では保存されていない。ヒトではLeuであるが、ラット・マウス・ウシではThrである。水生哺乳類であるアザラシおよびシロナガスクジラにおいてMetが観察される。このMet残基が長時間潜水することができクジラのミトコンドリア機能にどのような関連があるかは不明である。

メチオニンはイオウを含むアミノ酸であり、このイオウがスーパーオキシドアニオン (superoxide anion , $\text{O}_2^{\cdot-}$) あるいはパーオキシナイトライト (peroxynitrite , ONOO^-) と反応し、メチオニンスルホキシド ($\text{methionine sulfoxide}$) となりうる (Levine et al., 1996)。さらに形成されたスルホキシドを修復しメチオニンに戻す機構が存在すると考えられている。すなわち蛋白の表面にあるMet残基は活性酸素種を捕捉するラジカスカベンジャーであると提唱されている。ヒトのミトコンドリアDNAによってコードされている13種の蛋白質のメチオニン含量を調べると5.4%であり、ND2遺伝子産物のメチオニン含量は6.9%であった。この値は一般の蛋白質のメチオニン含量 (2.2%) の2.2ないし3.1倍高い。もし、ミトコンドリアに対する酸化ストレスが加齢において重要であるならば、ND2サブユニットの長寿に関連するLeu237Met置換はミトコンドリアに対する保護作用を有している可能性があらう (Tanaka et al., 2000)。

3. 糖尿病とミトコンドリア DNA 多型

1) ミトコンドリア遺伝子型と1型糖尿病における糖尿病性腎症との関連

無作為抽出した大学病院の患者で、遺伝子頻度に有意の差が現れたことは、ミトコンドリア遺伝子多型の影響が、神経変性疾患だけでなく、広範な成人発症性の疾患に関与していることを示唆している。そこで、著者らは、心筋梗塞、脳血管障害、パーキンソン病、閉経、骨粗鬆症などについてMt5178A/C型の影響を検討している。ここでは糖尿病との関連について紹介する。

糖尿病は白内障・網膜症・神経障害などを惹起するとともに、動脈硬化を促進し心筋梗塞や腎障害をもたらす。糖尿病患者では家族歴を有するものが多く、遺伝的要因と環境要因の複合がその発症に関与していると考えられる。

1型糖尿病については、東京女子医大糖尿病センターの内潟安子助教授らと共同研究を行った。10年以上の罹患歴を有する1型糖尿病患者において、ミトコンドリア

遺伝子型と網膜症および腎症の重症度との関連を検討した。その結果、糖尿病性網膜症の進行と遺伝子型との関連は認められなかったが、糖尿病性腎症の重症化はMt5178A型の患者と比較してMt5178C型の患者で著しいことが明らかになった (Miura et al., 2000)。網膜症が進行するか否かは血糖値のコントロールの良否に大きく依存するのに対して、腎症の進行は遺伝的影響が大きいと考えられている。Mt5178C型は糖尿病性腎症の重症化に影響を与える遺伝的要因の一つであると推定される。

2) ミトコンドリア遺伝子型と2型糖尿病の動脈硬化病変との関連

2型糖尿病については、順天堂大学内科内分泌学講座の河盛隆造教授らと共同研究を行った。2型糖尿病患者群と正常コントロール群との間でMt5178A/Cの遺伝子頻度に有意差はなかったが、超音波エコーによって検出される動脈壁プラークの出現頻度もMt5178A型の患者よりMt5178C型の患者において有意に高いことが明らかになった (Matsunaga et al., 2001)。また頸動脈の内膜中膜厚 (IMT, intimal plus medial thickness) はMt5178A型の患者よりMt5178C型の患者の方が有意に大きかった。IMTは年齢依存性に増大するが、糖尿病患者においてMt5178A型は頸動脈の肥厚を8ないし9年分遅らせることが明らかになった。一方、糖代謝が正常である群ではMt5178C型群より、Mt5178A型群の方が動脈硬化の進行が約3年遅い傾向がみられたが、両群の間で統計学的に有意差はなかった (未発表)。このようにMt5178A型は、糖尿病の発症を抑制しないが、糖尿病患者における動脈硬化の進行を抑制する効果を有すると考えられた。

Nishikawaら (Nishikawa et al., 2000) はミトコンドリアが高グルコース濃度の条件下で培養された血管内皮細胞におけるスーパーオキシドの産生部位であると報告している。すなわち、コハク酸脱水素酵素阻害剤または脱共役剤の添加、あるいは脱共役蛋白質またはMn-SODの過剰発現によってミトコンドリアからの高血糖によって惹起されるROS産生を抑制することができたとしている。ミトコンドリア遺伝子型によってミトコンドリアからのROS産生量が部分的に規定されていると仮定すると、高血糖によって誘発される、あるいは加齢に伴う動脈硬化の進行は、異なったミトコンドリア遺伝子型を有する個体間で相違があると考えられる。

4. ミトコンドリア DNA 多型の世界的分布

1) 長寿に関連する遺伝子型の世界における分布

Cannらはヒトの進化に関する研究において、世界中から集めた147例の試料の中で、わずかに5例のアジア人と1例のヨーロッパ人がMt5178Aを有していたと報告

した (Cann et al., 1987). この観察はMt5178Aが世界のヒト集団の中で比較的稀であることを示している. Mt5178Aの頻度が日本人集団の中で45%と高いことは、日本の平均余命(女性83.59歳, 男性77.01歳)が世界で最も高いことと関連している可能性がある.

2) AFLP法による多型分析

最近, 著者は山形大学法医学の梅津和夫助教授と協同して, 日本・韓国・中国の10地点で得られた各100人以上のDNA試料(合計約1100人)について, AFLP(amplified fragment length polymorphism)分析法を用いてミトコンドリアDNAの一塩基多型(SNPs)を詳細に分析している. AFLPは, 1塩基の相違によってPCR産物の長さが約5塩基対だけ異なるように, また遺伝子座によってPCR産物が約10塩基対だけ異なるようにプライマーを設計し, 複数のプライマー対を同時に加えることによって, 1回のPCR増幅で複数のSNPsを同時に分析する系である. AFLP分析ではPCR-RFLP分析と異なり, 制限酵素による消化が不要であるので, PCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し, ゲルを染色するだけで結果が得られる.

3) 東アジアにおける長寿関連ミトコンドリア遺伝子多型の分布

長寿に関連する遺伝子型Mt5178Aは日本ばかりでなく, 韓国, 中国でも検出されたが, ドイツでは検出されなかった. Mt5178A型を有する群を, ミトコンドリアの16SリボソームRNA遺伝子の多型であるMt3010G→Aに注目して, Mt3010Aを有するA2型とMt3010Gを有するA1型に細分した. A2型は, 五島(44%), 新潟(43%), 沖縄(39%)で頻度が高く, 奄美(34%), 対馬(33%), 鳥取(29%)で頻度が低かった. 中国では華北(24%)でA2型の頻度が高く, 韓国(24%)と同じ頻度であったが, 中国東北部(17%), 華中(14%), 華南(11%)では頻度が低下した. これに対し, A1型は中国東北部(12%), 対馬(11%), 韓国(10%)に多く, 華中および華南では6%ないし4%であった. A1型は, 韓国と日本の間にある対馬(11%)で高頻度であったが, 五島と沖縄では検出されず, 新潟(3%)と奄美(2%)で低頻度であった.

成人発症性疾患に罹患しやすいと考えられるMt5178C型の群をNADH脱水素酵素の第3サブユニットの多型であるMt10398A→G(Leu114Phe)に注目して, Mt10398G型を有するB型(B1~B6型に細分)とMt10398A型を有するC型(C1~C7型に細分)に分類した. その結果, B1型が華南(44%)で主要な型であること, B2型が沖縄(22%)で頻度が高いこと, C1型がドイツ(70%)で主要な型であることなどが明らかになった. このようにミトコンドリア遺伝子型を一塩基

多型に基づいて細分類すると, 東アジアにおいて, 異なった多型を有する集団が一定の傾斜をもって分布していることが明らかになった.

4) ミトコンドリア多型分析から長寿社会へ

これらの結果は, 日本人およびアジア人の起源を考える上で興味あるデータではあるが, 医学的観点からも重要な示唆を与える. アジア人と欧米人の間でミトコンドリア遺伝子型に大きな差があることは, 欧米人のアルツハイマー病あるいはパーキンソン病患者において報告されたmtDNA変異の多くが欧米人に固有のものであり, 日本や東アジアの国々における疾患の解明にはアジア人を対象にした独自の研究が必要であることを示している. また, 日本と近隣諸国の間で, 遺伝子頻度に差はあるものの, 基本的な多型の種類が同じであることは, 日本においてミトコンドリア遺伝子型の成人発症性疾患への影響を研究することによって, 東アジア諸国の人々の健康づくりにも貢献できることを意味する.

結 語

現在, 著者らはヒトmtDNAのSNPデータベースを構築している. これによって日本人のミトコンドリアゲノムにおけるSNPsの全貌が明らかになる. 第二段階として, 発見された各SNPsの頻度をさらに多数の症例において分析することにより, 長寿の遺伝的要因あるいはそれぞれの疾患に関連する危険因子が明らかになると期待される. 第3段階では, 長期縦断研究と連携することによって, 生活習慣と遺伝因子の交絡関係を明らかにする. それぞれの個人のミトコンドリア遺伝子多型に応じて, どのような栄養指導, 運動処方, 薬剤選択を行うべきかなどを決定することによって, 健康で豊かな長寿社会を築くことができるものと期待している.

参考文献

- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden and I.G. Young (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290, 457-465.
- Brand, F., D. Kiely, W. Kannel and R. Myers (1992) Family patterns of coronary heart disease mortality: the Framingham longevity study, *J Clin Epidemiol*, 45, 169-174.
- Cann, R.L., M. Stoneking and A.C. Wilson (1987) Mitochondrial DNA and human evolution, *Nature*, 325, 31-36.
- Clayton, D.A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA, *Cell*, 28, 693-705.
- Hattori, K., M. Tanaka, S. Sugiyama, T. Obayashi, T. Ito, T. Satake, Y. Hanaki, J. Asai, M. Nagano and T. Ozawa (1991) Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: possible contributory factor to presbycardia, *Am Heart J*, 121, 1735-1742.
- Ikebe, S., M. Tanaka, K. Ohno, W. Sato, K. Hattori, T. Kondo, Y. Mizuno and T. Ozawa (1990) Increase of deleted mitochondrial

- DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence, *Biochem Biophys Res Commun*, 170, 1044-1048.
- Kovalenko, S.A., M. Tanaka, M. Yoneda, A.F. Iakovlev and T. Ozawa (1996) Accumulation of somatic nucleotide substitutions in mitochondrial DNA associated with the 3243 A→G tRNA^{Leu} (UUR) mutation in encephalopathy and cardiomyopathy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 222, 201-207.
- Levine, R.L., L. Mosoni, B.S. Berlett and E.R. Stadtman (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 15036-15040.
- Linnane, A.W., S. Marzuki, T. Ozawa and M. Tanaka (1989) Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases, *Lancet*, i, 642-645.
- Matsunaga, H., Y. Tanaka, M. Tanaka, J.S. Gong, J. Zhang, T. Nomiya, O. Ogawa, T. Ogihara, Y. Yamada, K. Yagi and R. Kawamori (2001) Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes, *Diabetes Care*, 24, 500-503.
- Miura, J., Y. Uchigata, J.-S. Gong, J. Zhang, Y. Iwamoto, K. Yagi and M. Tanaka (2000) Mitochondrial genotype Mt5178C is associated with diabetic nephropathy in Japanese type-1 diabetic patients, In : M. Shichiri, S. Shinn and N. Hotta (Eds), *Diabetes Mellitus : Recent Advances for the 21st Century*, Elsevier Science, Tokyo, pp. 271-274.
- Nakamura, N., N. Hattori, M. Tanaka and Y. Mizuno (1996) Specific detection of deleted mitochondrial DNA by in situ hybridization using a chimera probe, *Biochim. Biophys. Acta*, 1308, 215-221.
- Nishikawa, T., D. Edelstein, X.L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M.A. Yorek, D. Beebe, P.J. Oates, H.P. Hammes, I. Giardino and M. Brownlee (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage, *Nature*, 404, 787-790.
- Tanaka, M. and T. Ozawa (1994) Strand asymmetry in human mitochondrial DNA mutations, *Genomics*, 22, 327-335.
- Tanaka, M., J.S. Gong, J. Zhang, M. Yoneda and K. Yagi (1998) Mitochondrial genotype associated with longevity, *Lancet*, 351, 185-186.
- Tanaka, M., J. Gong, J. Zhang, Y. Yamada, H. Borgeld and K. Yagi (2000) Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis, *Mech. Ageing Dev.*, 116, 65-76.
- Yoritaka, A., N. Hattori, K. Uchida, M. Tanaka, Y. Mizuno and E.R. Stadtman (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2696-2701.
- Zhang, J., M. Yoneda, K. Naruse, H.J. Borgeld, J.S. Gong, S. Obata, M. Tanaka and K. Yagi (1998) Peroxide production and apoptosis in cultured cells carrying mtDNA mutation causing encephalomyopathy, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 46, 71-79.