

脳における多型性アリルアミン*N*-アセチル基転移 酵素(NAT2)の生化学的, 分子遺伝学的及び生態遺伝 学的研究

小川, 昌宣
九州大学生体防御医学研究所臨床遺伝学部門

<https://doi.org/10.15017/7237107>

出版情報 : 福岡醫學雜誌. 90 (4), pp.118-131, 1999-04-25. 福岡医学会
バージョン :
権利関係 :



原 著

脳における多型性アリルアミン *N*-アセチル基転移酵素 (NAT2) の
生化学的, 分子遺伝学的及び生態遺伝学的研究

九州大学生体防御医学研究所臨床遺伝学部門 (指導: 鈴木友和教授)

小 川 昌 宣

Biochemical, Molecular Genetic and Ecogenetic Studies of
Polymorphic Arylamine *N*-acetyltransferase (NAT2) in the Brain

Masanobu OGAWA

*Department of Clinical Genetics (Director: Prof. T. Suzuki), Medical Institute of Bioregulation,
Kyushu University, 4546 Tsurumihara, Beppu 874-0838, Japan*

Abstract Polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase (NAT2) is a detoxification enzyme in the liver. The activity of this enzyme differs for each individual. The difference of this enzyme activity is determined by the polymorphism of this enzyme which is known as *N*-acetylation polymorphism, and is a representative pharmacogenetic trait. The expression of NAT2 is also seen in brain tissue. However, its role has yet to be elucidated.

To clarify the role of NAT2 in the brain, I prepared recombinant NAT2 and examined whether or not L-kynurenine could be an endogenous substrate of NAT2. The spectrophotometric and high performance liquid chromatography analyses of the product of the acetylation reaction using the recombinant enzyme revealed that no *N*-acetylkynurenine was produced by NAT2 from L-kynurenine.

The topographical expression of NAT2 in the brain was examined by the *in situ* hybridization technique. Hybridization was done using seven digoxigenin-labeled oligonucleotide probes on fresh frozen sections and on paraffin embedded sections of adult rat brain tissue. Though strong signals were observed on the nerve cells and ependym cells, no signals were detected on the glial cells and blood vessels. This finding suggests that the nerve cell-specific endogenous substrate of NAT2 thus exists in the brain, and that the exogenous arylamines are metabolized in ependym.

Furthermore, the ecogenetic association of NAT2 and Alzheimer disease (AD) was assessed using the polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism technique for NAT2 genotyping. These results revealed the frequency of rapid acetylator phenotype to increase in the non-*apoE* $\epsilon 4$ carriers of late-onset AD (The odds ratio was 3.0, the 95% confidence interval was 1.3-7.3). This finding suggests that NAT2 polymorphism is one of the risk modifying factor for late-onset AD in non-*apoE* $\epsilon 4$ carriers.

は じ め に

多型性アリルアミン *N*-アセチル基転移酵素(polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase; NAT2) は, 肝臓における薬物代謝, 解毒酵素として知られている⁵⁰⁾¹⁸⁾. NAT2 は単一遺伝子によって支配

され、その変異によって生じる *N*-アセチル化多型は薬物代謝速度の個人差を規定しており、代表的な薬理遺伝形質である¹³⁾¹⁵⁾¹²⁾³²⁾。NAT 2 は通常、生体内では生成しないと考えられているアリルアミンやヒドラジンを基質としている (Fig. 1)。生体内にはもうひとつのアリルアミン *N*-アセチル基転移酵素、すなわち単型性アリルアミン *N*-アセチル基転移酵素 (NAT 1) が存在するが、発現量や基質特異性が異なっている³⁵⁾。NAT 2 の基質には、アミノ基をもつ医薬品、例えばイソニアジド、ヒドララジン、プロカインアミドや、ニトラゼパム、カフェイン、スルファサラジンなど体内でアミノ化合物になるものがある。また、アリルアミンの中にはベンジジンや 2-アミノフルオレンのように発癌性や細胞毒性を有するものも多く、食物や環境汚染物質として生体内に取り込まれたこうした物質を代謝する NAT 2 の多型は、発癌素因や神経変性疾患感受性との関連性が予想され、生態遺伝学的にも注目を集めている¹⁷⁾²⁹⁾³⁴⁾¹⁸⁾⁴⁴⁾⁴⁾。

NAT 2 は、肝臓の他にも脳、小腸、大腸、乳腺、皮膚、肺、腎臓、子宮、卵巣など多くの臓器にも発現が見られている¹⁰⁾²⁷⁾。こうした臓器の中でも、脳組織における発現は特に興味深い。脳における NAT 2 は、その活性がかなり高いことが報告されている³⁶⁾ものの、その生理的役割は明らかではない。外来性基質の代謝に関与していることが予想される一方、血液脳関門の存在を考えあわせた場合、内因性基質の存在も考えられる³⁶⁾²⁰⁾。NAT 2 は脳において、この未知の内因性基質、あるいは外来性基質の代謝に関与し、神経の病態生理に影響を与えていることが考えられる。

著者は、脳における NAT 2 の役割を解明する目的で、まず NAT 2 の内因性基質の候補としてトリプトファン代謝の中間代謝産物である *L*-キヌレニン (*L*-KYN) (Fig. 2)⁵⁾に着目し、NAT 2 の組み換え体蛋白を調製して、*N*-アセチルキヌレニンの生成について

検討した。また、ラット脳組織における NAT の発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーションで検討した。さらに、著者は *N*-アセチル化多型が疾患感受性を規定していると推定される神経疾患としてアルツハイマー病 (AD)⁴⁸⁾²⁸⁾ をとりあげ、NAT 2 の遺伝子型タイピングによって両者の関連性を生態遺伝学的に検討した。これらの検討により得られた知見をもとに、脳における NAT 2 の働きについて考察を行ったので報告する。

実験方法

L-キヌレニン (*L*-KYN) の *N*-アセチル化 組み換え体 NAT の作製

制限酵素部位を組み込んだプライマー対によるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって 4 種類の NAT cDNA 部分、すなわちラットアリルアミン NAT クローン A-1 (EC 2.3.1.87; GenBank accession U 01343, NAT1*13)、ラットアリルアミン NAT クローン B-7 (EC 2.3.1.5; GenBank accession U 01348, NAT2*2I)、ヒト単型性アリルアミン NAT クローン D-24 (EC 2.3.1.5; GenBank accession J 05255, NAT1*5)、ヒト多型性アリルアミン NAT クローン D-14 (EC 2.3.1.5; GenBank accession J 05255, NAT2*7B)³⁵⁾¹⁴⁾¹⁶⁾を増幅、回収した (遺伝子型の記述は Vatsis らによる国際表記法⁴⁹⁾に従った)。発現蛋白にヒスチジンタグを付与するように設計された発現ベクターである PROEx™ HT 発現システム (GIBCO BRL, Cat. No. 10711-018) に cDNA を組み込み、コンピータント大腸菌である DH5α を形質転換した。この大腸菌を LB-アンピシリン (Amp) 寒天培地にまき、得られたコロニーをベクターのライゲーション部位の前後の配列に相補的に設定したプライマーを用いた PCR にかけて、適当な長さのインサートが確認されたクローンを LB-Amp 培地で培養した。培養菌体より抽出したプラスミドを制限酵素処理して NAT 遺伝子のインサートを確認した。このようにして得られた NAT 発現大腸菌を LB-Amp 培地で培養し、IPTG 処理後 3 時間で菌体を回収、超音波破碎処理した上清をニッケル-NTG レジンカラムで精製、組み換え体 NAT を回収した。回収した蛋白は SDS-PAGE によって分子量を確認した。

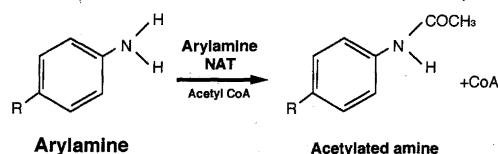


Fig. 1 Acetylation of arylamine by NAT.

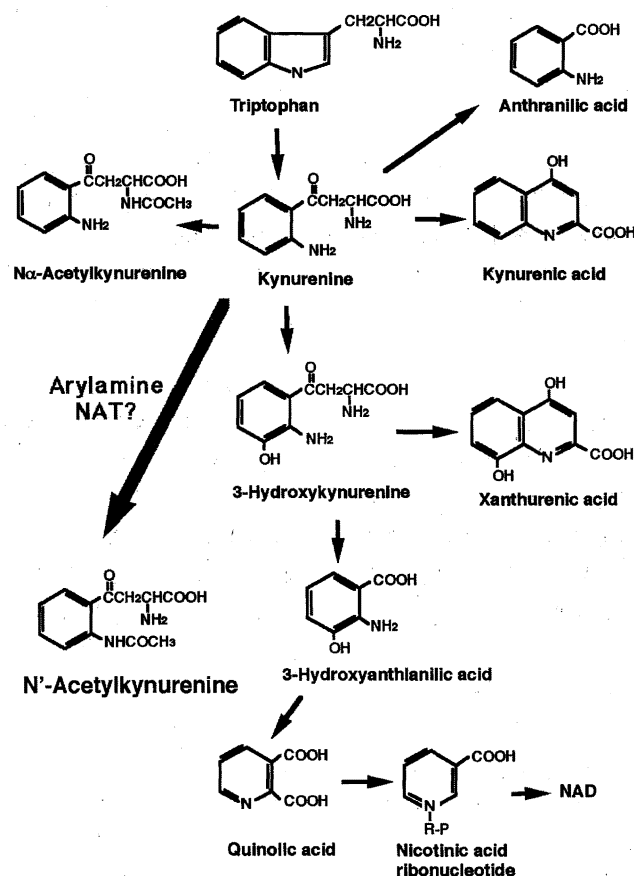


Fig. 2 Kynurenine pathway.

The supposed formation of *N'*-acetylkynurenine is indicated by a dotted arrow.

基質特異性の確認

回収した蛋白を酵素標品とし、NATの基質特異性を確認するため、パラアミノ安息香酸(PABA)、スルファメタジン(SMZ)、*p*-フェネチジン、プロカインアミド、トリプタミンなど基質として*N*-アセチル化実験をおこなった。Andresらの測定法³⁾に基づき、アリルアミンのSchiff's base形成による450 nm吸光を測定し、その減少をアセチル化の指標として利用した。

アセチル化の条件は、反応緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20°C, 1 mM EDTA, 1 mM ジチオエリスリトール(DTE), 50 μ M フェニルメチルスルフォニルフルオリド, 10 μ M ロイペプチン)により10 ng/mlに希釈した酵素標品50 μ lに、アリルアミン溶液(225 mM Tris-HCl, 4.5 mM EDTA, 4.5 mM DTE,

22.5 mM アセチルリン酸, 2.25 U/ml ホスホトランスアセチラーゼ (Boehringer Mannheim, Cat. No. 525 995), 0.5-1.0 mM アリルアミン)を20 μ l, 1 mM アセチル CoA を20 μ l 加え, 37°Cで1時間インキュベーションとした。20%トリクロル酢酸を50 μ l 加えて反応を停止, 遠心後上清を呈色に供した。呈色反応は, 500 μ l の5% (w/v) ジメチルアミノベンズアルデヒド(アセトニトリル溶液)を加えて遠心し, 室温で10分インキュベートした。反応の際, アセチル CoA を加えなかったものをブランクとして450 nmの吸光を測定した。アセチル化能は次式により求めた。

$(OD_{450nm} \text{ ブランク} - OD_{450nm} \text{ サンプル}) \times 12.8 \times 10^6 / \text{インキュベーション時間 (分)} \text{ (nmol/min/ml)}^3)$

また, 同様の実験をL-KYNを基質としておこなっ

た。

高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析

HPLC 分析は、日立製 L-6200 Intelligent Pump, L-4200 UV-VIS Detector, D-2500 Chromato-Integrator によるシステムで、カラムは Wakopak Wakosil-II 5 C 18 RS (和光, 内径 4.6 mm, 150 mm) を用い、移動層は 0.1% トリフルオロ酢酸 (アセトニトリル濃度勾配 0 → 40%/40 分)、検出は UV 260 nm の吸光測定でおこなった。L-KYN を基質として、前述のようにアセチル化反応をおこなった。反応停止後、遠心し、その上清をろ過し、20 μ l を HPLC に供した。人工的に合成された *N*-アセチルキヌレニンと *N* α -アセチルキヌレニンをアセチル化の標品として用いた。反応時間は最大 24 時間まで延長した。

脳における NAT 2 の分布

組織切片の作製

成熟 SD ラットをエーテル麻酔下に断頭し、摘出した肝臓、脳を直ちにジエチルピロカルボン酸 (DEPC) 処理水で洗い、5 mm 厚に薄切し、液体窒素により急速凍結した。シランコート処理したスライドガラス上に 5 μ m 厚の新鮮凍結切片を作製した。切片は 65°C のホットプレート上で乾燥した後、未固定のままプレパラートボックスに入れて -80°C に保存した。同時にホルマリン固定後、パラフィン包埋した切片も作製し、37°C で一晩乾燥させた後、プレパラートボックスに保存した。

プローブの調製

NAT2*21 に対する 7 種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブを設定した (Fig. 3)。各プローブは 31-38 bp の長さで互いに重複する部分を持たず、NAT1*13 の配列に対して 25% 以上のミスマッチを有するように設計された¹⁰⁾。それぞれに対して相補的な配列をセンスプローブとして用意した。同様にして、NAT1*13 に対するオリゴヌクレオチドプローブも作製した。DIG オリゴヌクレオチド・テイルングキット (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1417 231) を用いた 3' テーリング反応によってジゴキシゲニン-dUTP ラベルをおこなったものを以下の実験に用いた。プローブの特異性は、NAT 1, 2 の cDNA をプロッ

トしたナイロンメンブレンに対するハイブリダイゼーションによって確認した。

RNA 保存度の検討

スライドガラスに貼付した臓器切片を剝離し、ISOGEN (ニッポンジーン, Cat. No. 311-02501) にて処理し、RNA を抽出した。この RNA サンプルからランダムプライマーを用いて逆転写をおこなった。NAT 2 の mRNA によって特異的に出現する 203 bp の DNA を増幅するように 5' 非翻訳領域と翻訳領域とに設定したプライマーを用いて、変性温度 92°C、アニリング温度 55°C、伸長反応温度 74°C、30 サイクルで PCR をおこなった (Astec, PC-700)。PCR 産物は、2% アガロースゲル電気泳動を行って確認した。

in situ ハイブリダイゼーション

未固定凍結切片とホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて前述のプロープにて *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった。パラフィン切片は、キシレンで 10 分間透徹して脱パラフィンした後、99% エタノールでキシレンを洗い落とし、以下 99%, 90%, 70%, 30% のエタノールにより徐々に親水化した。DEPC 処理水で洗った後、プロテアーゼ K 溶液 (1 μ g/1 ml となるように 100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA 溶液で希釈し、37°C で 30 分間自己消化した) で 37°C、5-30 分間処理した。処理後、DEPC 処理水で軽く洗い、4% パラホルムアルデヒドで 10 分間後固定を行った。DEPC 処理水で洗い、以下、順次 70%, 90%, 99% エタノールにより脱水処理を行い、風乾した後、ハイブリダイゼーションに供した。凍結切片については前処理はおこなわず、直接ハイブリダイゼーションに供した。

ハイブリダイゼーション緩衝液の組成は、4 $\times$ SSC, 50% ホルムアミド, 10% 高分子デキストラン, 1 $\times$ デンハート液, 100 μ g/ml サケ精子 DNA, 250 μ g/ml tRNA, 100 μ g/ml poly A, 5 μ g/ml poly dA, 10-100 ng/ml プローブとした⁹⁾。37°C で 16 時間インキュベーションを行い、4 $\times$ SSC にて室温での洗浄を 15 分間、2 回おこなった後、42°C に加温した 1 $\times$ SSC で 15 分間、2 回洗浄した。検出反応はアルカリ性フォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体による発色反応を利用した (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1 093 657)。すなわち切片を緩衝液 1 (100 mM Tris-HCl,

150 mM NaCl, pH 7.5, 20°C)で軽く洗い, 緩衝液 2 (ブロッッキング剤を 0.5% になるように緩衝液 1 に溶解)で 60 分間ブロッッキングをおこなった。アルカリ性フォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体溶液(150 mU/ml になるよう緩衝液 1 で希釈)で 60 分インキュベートした後, 緩衝液 1 で 10 分間 2 回洗った。緩衝液 3 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5, 20°C)で 5 分間インキュベートした後, 発色溶液(70% 4-ニトロブルーテトラゾリウム塩のジメチルホルムアミド溶液 45 μ l と 50 mg/ml 5-臭化-4-塩化-3-インドールリン酸トリイジニウムのジメチルホルムアミド溶液 35 μ l を 10 ml の緩衝液 3 に添加したもの)に浸し, 暗所で一晩発色させた。緩衝液 4 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 20°C)で発色を停止させ, クリスタルマウント (biomeda co., Cat. No. M 02)で封入し, 鏡検した。

アルツハイマー病 (AD) における *N*-アセチル化多型

対象

筑波大学附属病院を受診した 80 名の血縁関係のない日本人の AD 患者⁵²⁾を対象とした。AD の診断は, NINCDS-ADRDA の診断基準に基づいてなされた³³⁾。痴呆症状の発症年齢によって, 晩発性と若年性へと分類した。晩発性 AD は 60 歳以降に発症した 53 名 (男性 5 名, 女性 48 名, 平均発症年齢 73.5 $\pm$ 6.8 歳)で, そのうち 13 名は病理解剖によって AD の病理診断を受けた。若年性 AD は 60 歳未満に発症した 27 名 (男性 11 名, 女性 16 名, 平均発症年齢 52.4 $\pm$ 5.5 歳)で,

10 名は病理解剖による病理診断を受けた。対照群は健康な日本人 257 名 (男性 175 名, 女性 82 名, 平均年齢 51.0 $\pm$ 6.8 歳)である。

N-アセチル化多型の遺伝子型タイピング

インフォームドコンセントの後, 末梢血を採取し, 白血球より SDS-フェノール法によりゲノム DNA を抽出した³⁹⁾。AD 患者の DNA サンプルの一部は, 死後, 脳組織より抽出された。既に報告した方法¹⁾に基づき, PCR により *NAT2* の多型部分 559 bp を増幅し, 制限酵素 *Asp* 718, *Bam*HI, *Taq*I により多重消化した。4.5%アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し, 切断片長多型により *NAT2* の遺伝子型を決定した。このようにして求められた遺伝子型から表現型を推定した。すなわち, 遺伝子型 *NAT2**4/*4 を迅速型, *NAT2**4/*5B, *NAT2**4/*6A, *NAT2**4/*7B を中間型, *NAT2**5B/*5B, *NAT2**5B/*6A, *NAT2**5B/*7B, *NAT2**6A/*6A, *NAT2**6A/*7B, *NAT2**7B/*7B を遅延型とした。

アポリポ蛋白質 E (ApoE) タイピング

上記 DNA サンプルを用いて, Wenham らの方法⁵¹⁾に基づいて *ApoE* の遺伝子型タイピングをおこなった。すなわち, PCR によって 227 bp の DNA を増幅し, 制限酵素 *Hha*I で消化し, 20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により DNA 断片を分離し, 切断片長多型から遺伝子型を決定した。

統計学的解析

有意差の検定は χ^2 検定によっておこなった。p < 0.05 を有意差ありとした。オッズ比は 2 $\times$ 2 表を用いて計算した。

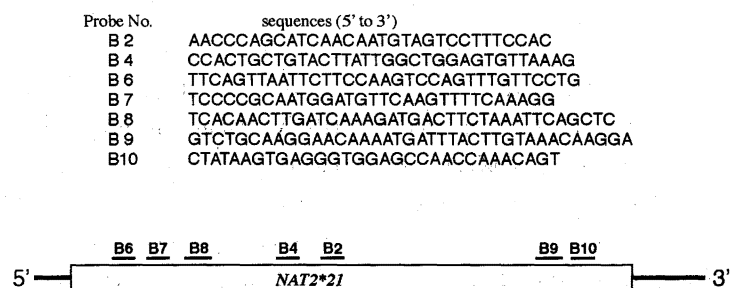


Fig. 3 Probes used for *in situ* hybridization.

The sequences of the seven probes are shown. Their positions on *NAT2**21 are indicated by bars.

結 果

L-キヌレニン (L-KYN) の *N*-アセチル化

組み換え体 NAT の作製と基質特異性の確認

レジンカラムによって回収したヒト NAT 酵素標品の基質特異性を Table 1 に示す。NAT 1, NAT 2 両方の基質となるプロカインアミドを基準として酵素活性の比をとってみると, NAT 1 では PABA, NAT 2 では SMZ が特異的な基質であることがわかった。この結果は以前に報告されている各々の酵素の基質特異性⁹⁾³⁵⁾と一致しており, 組み換え体蛋白が正常に発現, 機能していると考えられた。ラットの組み換え体蛋白についても同様に基質特異性の確認をおこなった²⁴⁾¹⁴⁾¹⁶⁾ (データ割愛)。

L-KYN を基質として, 吸光度の変化を観察したが, 明らかな変化は見られなかった (Table 1)。

HPLC 分析

HPLC における L-KYN の保持時間 (RT) は 16.5 分, *N*-アセチルキヌレニンの RT は 18.0 分, *N* α -アセチルキヌレニンの RT は 25.4 分であった (Fig. 4A, C, D)。L-KYN を基質とした実験において, *N*-アセチルキヌレニンの RT に相当する位置にピークは見いだされなかった (Fig. 4B)。標品とした *N*-アセチルキヌレニンは, この測定条件において, 20 pmol まで検出可能であった。アセチル化反応後の試料には, RT=20 分に小さなピークが出現したが, これはアセチル化反応後の全てのクロマトグラムに出現し, さらに基質を加えないものにも出現するため, アセチル CoA に由来するピークであると考えられた。

脳における NAT 2 の分析

逆転写 PCR (reverse transcriptase-PCR ; RT-PCR)

凍結脳切片から抽出し, 逆転写後, PCR をおこなった RNA サンプルにおいて, 2 %アガロースゲル電気泳動によって, 予想される大きさ (203 bp) のバンドが確認された (Fig. 5)。逆転写をおこなわなかったもの

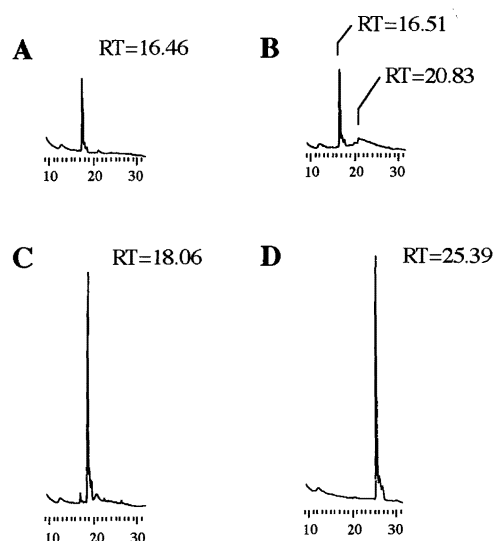


Fig. 4 HPLC chromatograms of kynurenines.

- A. L-kynurenine
- B. kynurenine after acetylation reaction
- C. *N*-acetylkynurenine
- D. *N* α -acetylkynurenine

Neither *N*-acetylkynurenine nor *N* α -acetylkynurenine were observed in the sample B.

Table 1 Substrate specificity of recombinant *N*-acetyltransferases expressed from the cDNA of the human liver

cDNA expressed	<i>N</i> -acetyltransferase activity ($\times 10^2$ nmol/ng/min)			
	Procaineamide	<i>p</i> -Aminobenzoic acid	Sulfamethazine	Kynurenine
NAT2	1.52 (1)	0.21 (0.14)	≥ 8.86 (≥ 5.82)	0.14 (0.09)
NAT1	3.17 (1)	≥ 9.64 (≥ 3.04)	1.64 (0.52)	0.15 (0.05)

NAT2: human polymorphic NAT clone D14, NAT2*7B

NAT1: human monomorphic NAT clone D24, NAT1*5

The ratios of the acetylation rate to that for procaineamide are indicated in parentheses.

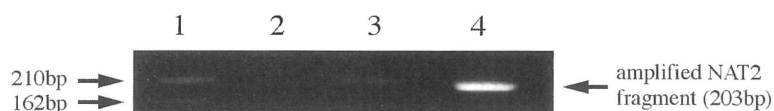


Fig. 5 The RT-PCR products from extracted mRNA.

1. Marker
 2. mRNA from a brain section, RT (-)
 3. mRNA from a brain section, RT (+)
 4. positive control (PCR product from cDNA)
- An amplified NAT2 fragment was only observed in lanes 3 and 4.

ではこのバンドは出現せず、RNA 由来のバンドであることが示された。

in situ ハイブリダイゼーション

肝組織における観察では、肝細胞にびまん性かつ不均一にシグナルが認められた。肝小葉内のシグナルは、門脈索周辺の肝細胞に強く、中心静脈周辺の肝細胞には弱い傾向がみられた。シグナルは肝細胞の細胞質にあり、核にはみられなかった (Fig. 6A)。切片を RNase 処理したり、ラベルしていないプローブを用いることによって、このシグナルは消失した (Fig. 6B)。門脈索自体や Kupffer 細胞にはシグナルは認められなかった。

脳における *in situ* ハイブリダイゼーションでは、凍結切片においては、海馬の顆粒細胞層、大脳皮質の神経細胞、脳室上衣細胞に強いシグナルが見られた (Fig. 7A, B, C)。一方、大脳白質部分にもシグナルが見られたが、このシグナルはセンスプローブを用いた場合にも出現した (データ割愛)。

パラフィン切片においては、海馬の顆粒細胞層、脳室上衣細胞に強いシグナルが認められた。血管内皮細胞、間質細胞でのシグナルはみられなかった (Fig. 7E,

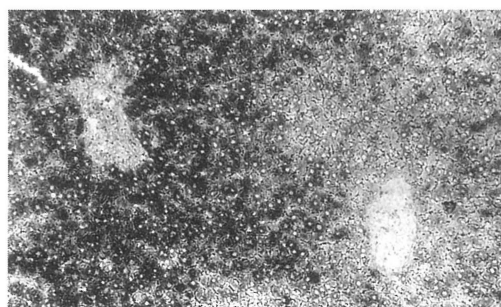
F)。

これらのシグナルは、切片の RNase 処理や、未ラベルのプローブを用いることで消失した (Fig. 7D)。

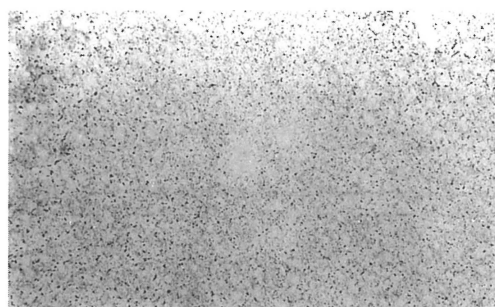
NAT 1 に対するプローブを用いた場合も同様の結果であった (データ割愛)。

アルツハイマー病 (AD) と NAT 2 多型との関連性

AD 患者群とコントロール群における *N*-アセチル化多型の推定表現型の分布と対立遺伝子頻度を Table 2 に示す。コントロール群の分布は、日本人において報告されている分布に一致しており¹³⁾¹⁴⁾、またハーディー-ワインベルグの平衡状態にあった。コントロール群と晩発性、若年性いずれの AD 群との間でも、表現型分布にも対立遺伝子頻度にも有意差は認められなかった。次に、晩発性 AD のリスクファクターとされている *ApoE* $\epsilon 4$ の存在の有無に留意して解析をおこなった。その結果を Table 3 に示す。*ApoE* $\epsilon 4$ の保有者においては、発症時期にかかわらず、コントロール群との間で表現型分布に有意差を認めなかった。しかし、*ApoE* $\epsilon 4$ 非保有者の群においては、晩発性 AD の群で迅速型の表現型が多いことがわかった。この群に

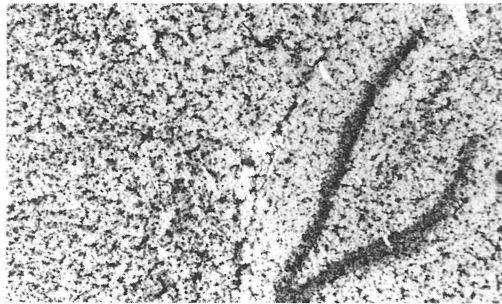


A: Hybridized with antisense probes. $\times 60$

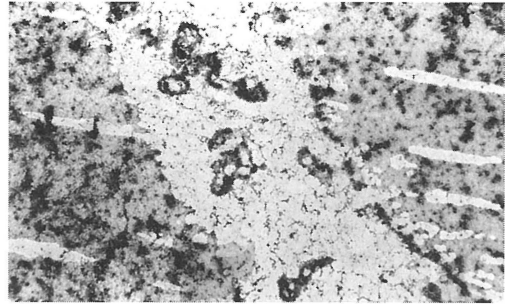


B: Negative control. $\times 60$

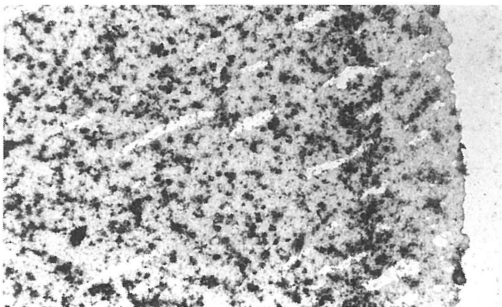
Fig. 6 *In situ* hybridization for NAT2 in the rat liver.



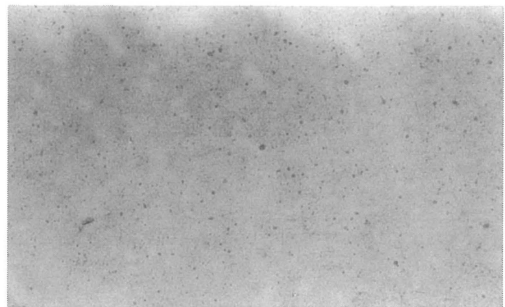
A: Hippocampus. ×25



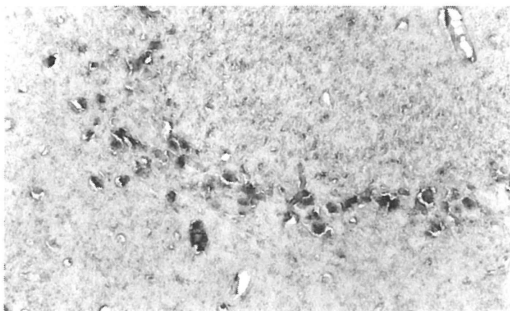
B: Lateral ventricle. ×60



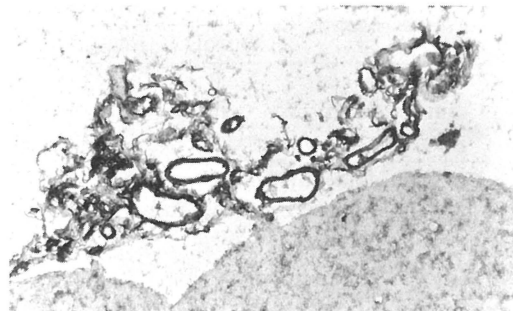
C: Brain cortex. ×60



D: Brain cortex (Negative control). ×60



E: Hippocampus. ×120



F: Lateral ventricle. ×120

Fig. 7 *In situ* hybridization for *NAT2* in the rat brain.

A-D: Fresh frozen sections. E and F: Paraffin embedded sections.

における迅速型では、中間型、遅延型の表現型に比べてオッズ比が3.0に増加していた(95%信頼区間(95% CI) 1.3-7.3)。若年性AD群では、このオッズ比の増加は観察されなかった(オッズ比1.4, 95% CI 0.5-3.7)。

考 察

N-アセチル化多型は生態遺伝学的に興味深い形質

であるが、薬物代謝や発癌性変異原物質の代謝の観点から、肝臓における酵素の役割ばかりに注目が集まり²¹⁾⁶⁾¹³⁾³⁵⁾³²⁾、その他の臓器におけるその働きの研究はほとんどなされていなかった。脳における *NAT2* の発現は、その活性の高さから外来性のみならず、特異的な内因性のアリルアミンを基質とし、ニューロンの機能あるいはそれを防御維持する上で重要な役割を担い、ある種の中樞神経変性疾患に対する感受性を規定

Table 2 Acetylator genotype, predicted phenotype and allele frequency of *NAT2* in the patients with Alzheimer's disease (AD) and controls.

Acetylator phenotype	Genotype	Controls n=257 (%)	Late-onset AD n=53 (%)	Early-onset AD n=27 (%)
Rapid	<i>NAT2</i> *4/*4	111 (43.2)	30 (56.6)	10 (37.0)
Intermediate	<i>NAT2</i> *4/*5B	3	0	1
	<i>NAT2</i> *4/*6A	79	8	7
	<i>NAT2</i> *4/*7B	35	8	6
Slow	<i>NAT2</i> *5B/*5B	0	0	0
	<i>NAT2</i> *5B/*6A	4	1	0
	<i>NAT2</i> *5B/*7B	3	0	0
	<i>NAT2</i> *6A/*6A	12	3	2
	<i>NAT2</i> *6A/*7B	7	2	1
	<i>NAT2</i> *7B/*7B	3	1	0
Allele frequency				
	<i>NAT2</i> *4	0.660	0.717	0.630
	<i>NAT2</i> *5B	0.019	0.009	0.019
	<i>NAT2</i> *6A	0.222	0.160	0.222
	<i>NAT2</i> *7B	0.099	0.113	0.130

No significant differences were observed between the controls and either group of AD.

Table 3 The distributions of the acetylator phenotype in the late-onset AD, early-onset AD patients and the controls divided into carriers or non-carriers of the *apoE* $\epsilon 4$ allele.

Acetylator phenotype	non- $\epsilon 4$ carrier			$\epsilon 4$ carrier		
	Controls	Late-onset AD	Early-onset AD	Controls	Late-onset AD	Early-onset AD
Rapid	90	18*	8	21	12	2
Intermediate	97	6	9	20	10	5
Slow	24	2	2	5	5	1

*: Significant difference was observed in the distribution of the acetylator phenotype between the controls and late-onset AD in non- $\epsilon 4$ carrier. ($p < 0.05$)

していると考えられる。

NAT には、種による基質特異性に差があり、同じ型の酵素でも、その生体内における役割は異なっていることが推測される。例えば、ヒトにおいては NAT 1 も NAT 2 もアリルアミンを基質とし、アリルアルキルアミンを代謝しない³⁵⁾が、ラットにおいては、NAT 1 はアリルアルキルアミンを代謝する能力を持つ¹⁶⁾。また、遺伝子多型が広く知られているのは、NAT 2 の方であるが、ヒトにおいて主に発現しているのは NAT 2 である³⁵⁾のに対し、ラットにおいては NAT 1 である¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁰⁾。このため、ラットにおける NAT 2 をヒトにおける NAT 2 に相当するものであると単純に断じることは、その生体内ではたらしきを正しく評価することに繋がらない。この観点から、著者はラットにおい

ては NAT 1 と NAT 2 とを平行して検討することとした。

Gaudet らは脳内における NAT の内因性基質として、L-KYN を想定した(キヌレニン仮説)²⁰⁾、L-KYN は L-トリプトファン代謝における古典的キヌレニン経路の中間代謝産物である (Fig. 2)。L-KYN の投与によって、髄液中のキヌレニン酸やキノリン酸の量が増加する²⁵⁾が、これらキヌレニンの代謝物質は NMDA レセプターのアンタゴニスト、またはアゴニストとして作用し、AIDS 脳症など炎症性神経疾患に伴う変動が報告されている⁴¹⁾³¹⁾³⁸⁾⁴²⁾。NAT 2 による *N*⁺-アセチルキヌレニンの生成があれば、この経路の調節機構として機能することが推定される。今回著者が行った HPLC による解析では、*N*⁺-アセチルキヌレニンに相

当する RT=18 分のピークは認められなかった (Fig. 4B). NAT 1 5 (ヒトの NAT 1), NAT 1 13, NAT 2 21 (ラットの NAT 1, NAT 2) でも同様であった. このことから, L-KYN は NAT の基質とはなり得ないことが示された.

アリルアミンの Schiff's Base 形成による発色反応は, 一定の濃度範囲内では基質による発色の度合いにほとんど差がなく, 簡便かつ迅速に酵素活性を比較することができる⁹⁾. しかし, 今回の L-KYN のように, アセチル化の有無が不明な基質の場合には, わずかな吸光度の変化しか得られない場合, アセチル化に伴うものなのか, 測定誤差なのかが判然としないため, あくまでも既知の基質に対する簡便法として用いるべきであると考えられた.

未固定凍結切片での *in situ* ハイブリダイゼーションは, 固定や脱水のステップが省かれるため RNA の保存度が良好で, シグナル量も多く得られる⁹⁾. 一方, パラフィン包埋切片では, 前処理の行程が多くなり, その分切片の剝離脱落や RNA の分解が問題となってくるが, 器具や溶液を RNase free とすることや, 注意深い実験操作によって凍結切片よりも解像度の高い観察を行い得る. この場合, プロテアーゼ K による処理が必須となってくるが, 著者の場合, 1 μ g/ml, 10-20 分程度の処理によってバックグラウンドが減少し, 核に観察された非特異的なシグナルが消失するなど, 良好な結果が得られた. しかし, プロテアーゼ K による処理は, 組織の種類や固定の状態によって至適条件が大きく異なるため, 切片を作製する毎に十分な検討が必要である. 切片の厚さは, 著者の場合, 凍結切片で 5-10 μ m, パラフィン切片で 5 μ m で良好な結果が得られた. また, ハイブリダイゼーション緩衝液への 10% 程度の高分子デキストラン (分子量 50 万) の添加は不可欠で, 低分子 (分子量 5000) のものを添加したり, あるいは全く添加しないものではシグナルは得られなかった.

ラット肝凍結切片における実験では, 門脈索周囲の肝細胞に強いシグナルがみられ, 中心静脈に向かうにつれてシグナルが弱まってゆく傾向がみられた. これはパラフィン封埋切片を用いた Debiec-Rychter ら¹⁰⁾ による実験結果とは逆の傾向であるが, Rappaport の肝房 (liver acinus) の概念³⁷⁾ に従うと, 流入する血液

に最も早く接する微小循環領域 (microcirculatory zone) 1 に相当する部分に多く, 血液の流出路周辺にあたる領域 3 に相当する部分に弱く発現していることを示しており, 著者の結果の方が合目的な発現分布であると考えられる.

ラット脳組織を用いた著者の実験では, 脳室上衣や神経細胞, 特に海馬の顆粒細胞層を構成する細胞に強いシグナルが見られた. 間質部分でのシグナルも見られたが, このシグナルはセンスプローブでも観察され, 非特異的なバックグラウンドと考えられた. パラフィン包埋切片では, 脳室上衣や神経細胞の胞体に一致してシグナルが観察されたが, 血管内皮細胞や間質部分でのシグナルは観察されなかった. この結果は Debiec-Rychter らの実験の結果と一致している¹⁰⁾.

周知のように, 脳には血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB) が存在しており, その本体は血管内皮細胞と星状細胞のタイトジャンクションと, 特異的物質輸送であると考えられている¹⁹⁾⁴⁷⁾²⁾. BBB が存在することによって, 外来性のアリルアミンが脳実質内に直接進入することは困難であり, 神経細胞に特異的に認められる NAT 2 の発現は, 内因性の基質, 特に神経細胞に多く含まれるような基質の存在を示唆するものと考えられ, 神経伝達物質の代謝に関与していることも考えられる³⁶⁾²⁰⁾.

一方で, 脳室上衣細胞にも強い発現が見られたことは注目に値する. 髄液産生のもと考えられている脈絡叢は有窓の血管内皮を有しており, さらに, 脳の細胞外液中のゼノバイオティクスは髄液中に移行することが報告されている⁸⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾. 細胞外液や血液中から髄液中に移行したゼノバイオティクスは脳室上衣細胞に発現がみられた NAT 2 により代謝される可能性が考えられ, また逆に, 脳室上衣細胞はゼノバイオティクスに対する代謝の場となっていることも示唆される.

今回は検討できなかったが, NAT 2 の発現部位として, 脳室周囲器官 (CVOs) も予想される. CVOs は血管内皮細胞による BBB が存在しない部位であり, 神経内分泌機能を有すると考えられている²²⁾²³⁾²⁶⁾. ラットの NAT1*13, NAT2*21 がクローニングされた松果体もこの CVOs の一つである¹⁶⁾. また, CVOs は薬物や環境汚染物質などの外来性基質に直接接する器官でもあるため, その代謝を担っている可能性もある.

神経変性疾患と *N*-アセチル化多型との関連を明らかにする目的で、環境要因が発症に関与していると考えられている AD における NAT 2 の多型の分布を検討した。*N*-アセチル化多型と AD との関連については、Stevenson ら⁴⁸⁾ や Ladero ら²⁸⁾ によって既に検討がなされており、関連性はないとされていた。しかし、彼等がおこなった試験薬剤の経口負荷による血中濃度測定法では、*N*-アセチル化多型の迅速型と中間型の識別ができないなどの欠点がある¹¹⁾³²⁾⁴⁴⁾。また一方で、AD の分子遺伝学的研究の進展から、単一遺伝子の障害による AD⁷⁾³⁰⁾⁴³⁾ や、アポリポ蛋白質 E (ApoE) 多型が関与している AD が明らかとなってきた。特に晩発性 AD では、*ApoE* ϵ 4 が疾患感受性を規定していることが報告されている⁴⁰⁾⁵²⁾。このため、AD のリスクファクターとしての *N*-アセチル化多型の検討においては、より正確な遺伝子型タイピングの利用と ApoE 多型に留意した検討が必要である。

Table 2 に示すように、コントロール群と AD 患者群とでは、NAT 2 の表現型分布、対立遺伝子頻度に、有意差は認められなかった。しかし、*ApoE* ϵ 4 の有無を考慮して検討した場合、*ApoE* ϵ 4 をもたない晩発性 AD 患者群においては迅速型の表現型が多いことが示された (Table 3)。これは、NAT 2 が *ApoE* ϵ 4 をもたない晩発性 AD の発症に関与している可能性を示唆している。晩発性 AD においては、*ApoE* ϵ 4 陽性の者の頻度が多く⁴⁰⁾⁵²⁾、NAT 2 多型による影響が検出されにくかった可能性があり、今後のさらなる検討が必要であると考えられる。

総 括

脳内での多型性 *N*-アセチル基転移酵素 (NAT 2) の働きを生化学的、分子遺伝学的、及び生態遺伝学的に検討した。まず、NAT 2 の内因性基質の候補として *L*-キヌレニン (*L*-KYN) の *N*-アセチル化をラットとヒトの組み換え体蛋白を作製して検討した。酵素反応産物の分光学的及び HPLC による分析では、*N*-アセチルキヌレニンの生成は観察されなかった。また、脳における発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって検討したところ、脳室上衣細胞と神経細胞、特に海馬の顆粒細胞層を構成する細胞に強い発現が認められた。さらに、NAT 2 の多型によって生じる *N*-アセ

チル化多型とアルツハイマー病 (AD) の関連性を生態遺伝学的に検討したところ、特定の患者群においては *N*-アセチル化多型の迅速型が疾患の発症に関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、脳内における NAT 2 について以下のことが結論される。

1. *L*-KYN が NAT 2 の基質である可能性 (キヌレニン仮説) は否定的である。
2. NAT 2 は、海馬の顆粒細胞層を構成する神経細胞や脳室上衣細胞に強く発現している。
3. NAT 2 は、アポリポ蛋白質 E ϵ 4 非保有者における晩発性 AD の発症に関与していることが示唆される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接ご指導を賜りました九州大学生体防御医学研究所臨床遺伝学部門 鈴木友和元教授*、ならびに九州大学医学部婦人科学産科学教室 中野仁雄教授に心より感謝いたします。また、研究の継続を快くお認め下さいました九州大学生体防御医学研究所臨床遺伝学部門 名和田新教授、千々岩芳春助教授に感謝いたします。cDNA をご恵みいただきました株式会社 BRL 研究開発部 出口武夫博士、*N*-アセチルキヌレニンを合成していただいた九州工業大学情報工学部 竹中繁織助教授†、*N*-アセチルキヌレニンを合成していただいたペプチド研究所 (大阪)、*in situ* ハイブリダイゼーションに関してご助言とご指導を賜りました兵庫医科大学解剖学教室第二講座 野口光一教授、ならびに九州大学生体防御医学研究所附属病院検査部 吉河康二助教授、アルツハイマー病患者の DNA 検体をご提供下さいました筑波大学臨床医学系神経内科 吉澤利弘講師、健常者の DNA 検体採取にご協力下さいました大分総合検診センター 辻秀男博士に謝意を表します。また、研究の遂行にご指導、ご助言、ご助力いただき、絶えず暖かい励ましを下さいました安部眞佐子助手、前田豊樹助手、小田和美実験助手をはじめとする教室の方々と、和氣徳夫教授をはじめとする九州大学生体防御医学研究所生殖生理内分泌学部門の皆様にも深くお礼申し上げます。さらに、凍結切片の作製にご協力下さいました九州大学生体防御医学研究所附属病院検査部 森大輔技師に感謝いたします。

*: 現 公立学校共済組合近畿中央病院院長

†: 現 九州大学工学系研究科化学システム工学専攻パイオプロセス化学講座 助教授

文 献

- 1) Abe M, Suzuki T and Deguchi T: An improved method for genotyping of *N*-acetyltransfer-

ase polymorphism by polymerase chain reaction. Jpn. J. Hum. Genet. 38: 163-168, 1993.

2) Aigner A, Wolf S and Gassen HG: Transport and detoxication: principles, approaches, and perspectives for research on the blood-brain barrier. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36: 24-41, 1997.

3) Andres HH, Klem AJ, Szabo SM and Weber WW: New spectrophotometric and radiochemical assays for acetyl-CoA: Arylamine *N*-acetyltransferase applicable to a variety of arylamines. Anal. Biochem. 145: 367-375, 1985.

4) Asada M, Goto H, Abe M, Tachibana T, Suzuki Y and Suzuki T: *N*-acetylation polymorphism in Japanese patients with sarcoidosis. Pharmacogenetics 7: 341-344, 1997.

5) Bender DA: Biochemistry of tryptophan in health and disease. Molec. Aspects Med. 6: 101-197, 1982.

6) Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M and Meyer UA: Human arylamine *N*-acetyltransferase gene: isolation, chromosomal localization, and functional expression. DNA Cell Biol. 9: 193-203, 1990.

7) Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J and Mullan M: Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. Nature 353: 844-846, 1991.

8) Cserr HF, Cooper DN and Milhorat TH: Flow of cerebral interstitial fluid as indicated by the removal of extracellular markers from rat caudate nucleus. Exp. Eye Res. 25 Suppl.: 461-473, 1977.

9) Dagerlind Å, Friberg K, Bean AJ and Hökfelt T: Sensitive mRNA detection using unfixed tissue: combined radioactive and non-radioactive in situ hybridization histochemistry. Histochem. 98: 39-49, 1992.

10) Debiec-Rychter M, Land SJ and King CM: Histological localization of messenger RNAs for rat acetyltransferases that acetylate serotonin and genotoxic arylamines. Cancer Res. 56: 1517-1525, 1996.

11) Deguchi T: Molecular pharmacology of polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase involved in the metabolism of arylamine drugs. Jpn. J. Clin. Med. 50: 877-886, 1992.

12) Deguchi T: Sequences and Expression of alleles of polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase of human liver. J. Biol. Chem. 267: 18140-18147, 1992.

13) Deguchi T, Mashimo M and Suzuki T: Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase in human liver. J. Biol. Chem. 265: 12757-12760, 1990.

14) Doll MA and Hein DW: Cloning, sequencing, and expression of *NAT1* and *NAT2* encoding genes from rapid and slow acetylator inbred rats. Pharmacogenetics 5: 247-251, 1995.

15) Ebisawa T and Deguchi T: Structure and restriction fragment length polymorphism of genes for human liver arylamine *N*-acetyltransferase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177: 1252-1257, 1991.

16) Ebisawa T, Sasaki Y and Deguchi T: Complementary DNAs for two arylamine *N*-acetyltransferases with identical 5' non-coding regions from rat pineal gland. Eur. J. Biochem. 228: 129-137, 1995.

17) Evans DAP: Survey of the human acetylator polymorphism in spontaneous disorders. J. Med. Genet. 21: 243-253, 1984.

18) Evans DAP: *N*-acetyltransferase. Pharmacol. Ther. 42: 157-234, 1989.

19) Fenstermacher JD: The pharmacology of the blood-brain barrier, In Neuwelt E (ed): Implications of the Blood-brain Barrier and its manipulation. pp 137-155, Plenum New York, 1989.

20) Gaudet S, Palkovits M and Nambodiri MAA: Regional distribution of arylamine and arylalkylamine *N*-acetyltransferase activities in the rat brain. Brain Res. 539: 355-357, 1991.

21) Grant DM, Blum M, Demierre A and Meyer UA: Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine *N*-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation. Nucleic Acids Res. 17: 3978, 1989.

22) Gross PM, Blasberg RG, Fenstermacher JD and Patlak CS: The microcirculation of rat circumventricular organs and pituitary gland. Brain Res. Bull. 18: 73-85, 1987.

23) Gross PM and Weindl A: Peering through the windows of the brain. J. Cereb. Blood Flow Metab. 7: 663-672, 1987.

24) Hein DW, Rustan TD, Bucher KD, Martin WJ and Furman EJ: Acetylator phenotype-dependent and -independent expression of arylamine *N*-acetyltransferase isozymes in rapid and slow acetylator inbred rat liver. Drug Metab. Dispos. 19: 933-937, 1991.

25) Heyes MP and Quearry BJ: Quantification

- of kynurenic acid in cerebrospinal fluid: effects of systemic and central L-kynurenine administration. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 530: 108-115, 1990.
- 26) Johnson AK and Gross PM: Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J.* 7: 678-686, 1993.
- 27) King CM, Land SJ, Jones RF, Debiec-Rychter M, Lee MS and Wang CY: Role of acetyltransferases in the metabolism and carcinogenicity of aromatic amines. *Mutat. Res.* 376: 123-128, 1997.
- 28) Ladero JM, Barquero MS, Coria F, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ and Benítez J: Acetylator polymorphism in Alzheimer's disease. *Eur. J. Med.* 2: 281-283, 1993.
- 29) Ladero JM, Kwok CK, Jara C, Fernandez L, Silmi AM, Tapia D and Uson AC: Hepatic acetylator phenotype in bladder cancer patients. *Ann. Clin. Res.* 17: 96-99, 1985.
- 30) Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu C, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD and Tanzi RE: Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973-977, 1995.
- 31) Martin A, Heyes MP, Salazar AM, Kampen DL, Williams J, Law WA, Coats ME and Markey SP: Progressive slowing of reaction time and increasing cerebrospinal fluid concentrations of quinolinic acid in HIV-infected individuals. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 4: 270-279, 1992.
- 32) Mashimo M, Suzuki T, Abe M and Deguchi T: Molecular genotyping of *N*-acetylation polymorphism to predict phenotype. *Hum. Genet.* 90: 139-143, 1992.
- 33) McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D and Stadlan EM: Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939-944, 1984.
- 34) Mommsen S and Aagaard J: Susceptibility in urinary bladder cancer: acetyltransferase phenotypes and related risk factors. *Cancer Lett.* 32: 199-205, 1986.
- 35) Ohsako S and Deguchi T: Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine *N*-acetyltransferases from human liver. *J. Biol. Chem.* 265: 4630-4634, 1990.
- 36) Ohtomi M and Deguchi T: Arylamine *N*-acetyltransferase activity in the chicken brain: Regional distribution and diurnal variation. *Biomed. Res.* 11: 405-408, 1990.
- 37) Rappaport AM: The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitrage zur Pathologie* 157: 215-243, 1976.
- 38) Saito K, Crowley JS, Markey SP and Heyes MP: A mechanism for increased quinolinic acid formation following acute systemic immune stimulation. *J. Biol. Chem.* 268: 15496-15503, 1993.
- 39) Sambrook J, Fritsch: Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1989.
- 40) Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, St. George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D and Roses AD: Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472, 1993.
- 41) Schwarcz R, Whetsell WO Jr. and Mangano RM: Quinolinic acid: an endogenous metabolite can produce axon sparing lesions in rat brain. *Science* 219: 316-318, 1983.
- 42) Sei S, Saito K, Stewart SK, Crowley JS, Brouwers P, Kleiner DE, Katz DA, Pizzo PA and Heyes MP: Increased human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) DNA content and quinolinic acid concentration in brain tissues obtained from patients with HIV-encephalopathy. *J. Infect. Dis.* 172: 638-647, 1995.
- 43) Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin J-F, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM and St. George-Hyslop PH: Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760, 1995.
- 44) Shibuta K, Nakashima T, Abe M, Mashimo M, Mori M, Ueo H, Akiyoshi T, Sugimachi K and Suzuki T: Molecular genotyping for *N*-acetylation polymorphism in Japanese patients with colorectal cancer. *Cancer* 74: 3108-3112, 1994.
- 45) Smith OR, Johanson CE and Woodbury DM: Uptake of ^{36}Cl and ^{22}Na by the brain-cerebrospinal fluid system: comparison of the permeability of the

blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. J. Neurochem. 37: 117-124, 1981.

46) Smith OR, Woodbury DM and Johanson CE: Uptake of ^{36}Cl and ^{22}Na by the choroid plexus-cerebrospinal fluid system: evidence for active chloride transport by the choroidal epithelium. J. Neurochem. 37: 107-116, 1981.

47) Staddon JM and Rubin LL: Cell adhesion, cell junctions and the blood-brain barrier. Curr. Opin. Neurobiol. 6: 622-627, 1996.

48) Steventon GB, Heafield MTE, Sturman S, Waring RH and Williams AC: Xenobiotic metabolism in Alzheimer's disease. Neurology 40: 1095-1098, 1990.

49) Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Dupret J-M, Evans DAP, Grant DM, Hein DW, Lin HJ, Meyer

UA, Relling MV, Sim E, Suzuki T and Yamazoe Y: Nomenclature for *N*-acetyltransferases. Pharmacogenetics 5: 1-17, 1995.

50) Weber WW and Hein DW: *N*-acetylation pharmacogenetics. Pharmacol. Rev. 37: 25-79, 1985.

51) Wenham PR, Price WH and Blundell G: Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. Lancet 337: 1158-1159, 1991.

52) Yoshizawa T, Yamakawa-Kobayashi K, Komatsuzaki Y, Arinami T, Oguni E, Mizusawa H, Shoji S and Hamaguchi H: Dose-dependent association of apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ with late-onset, sporadic Alzheimer's disease. Ann. Neurol. 36: 656-659, 1994.

(受付 1999-2-15)