

# Mitochondrial DNA Point Mutations in Patients with Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes, and Fatal Infantile Cardiomyopathy

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8352">http://hdl.handle.net/2297/8352</a>

## 脳卒中様発作を伴ったミトコンドリア脳筋症 および乳児致死型心筋症における ミトコンドリア DNA 点変異

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

井 野 秀 一

(平成3年8月20日受付)

脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症 (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes, MELAS) は心筋症を伴うことが多く、心不全は代謝性アシドーシスとともにその死因として重要である。近年 MELAS においてミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) の欠損が報告され、ミトコンドリア DNA (mitochondrial deoxyribonucleic acid, mtDNA) の突然変異がその原因として求められた。心筋症を伴う典型的な MELAS の2症例、およびその最重症型とされる乳児致死型心筋症 (fatal infantile cardiomyopathy, FICM) のミトコンドリア DNA 全塩基配列を、蛍光色素による DNA 自動解析装置を用い、直接塩基配列決定法にて決定した。典型的な MELAS の2症例に共通して、ロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号 3,243 に A から G への塩基転位型変異が認められた。さらに FICM では、ロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号 3,254 に C から T へ、イソロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号 4,317 に A から G へ、およびトリプトファン tRNA 遺伝子上の塩基番号 5,554 に C から T への変異が見いだされた。これらの変異のうち、ロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号 3,243 の A 塩基およびイソロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号 4,317 の A 塩基はヒト、ウシ、ラットで保存されており、特に前者ではマウス、ニワトリ、カエル、ウニ、およびシヨウジョウバエまで保存されていた。したがって tRNA 分子が機能するために重要な部位と考えられ、これらの変異による tRNA 分子の変化が、ミトコンドリア蛋白の合成障害による生体エネルギー産生低下を引き起こす可能性が考えられた。ロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号 3,243 での A から G への塩基転位型変異により制限酵素 *Apa* I の認識部位が新たに形成される。制限酵素 *Apa* I による消化では、他の典型的な MELAS 2例にも同じ変異が認められたが、ミトコンドリア脳筋症の他の臨床疾患単位である慢性進行性外眼筋麻痺 (chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO) 2例、福原病 (myoclonus epilepsy with ragged-red fibers, MERRF) 1例ではこの変異は認められず、本症に特異的であった。心筋症を伴う MELAS に共通して、mtDNA のロイシン tRNA の変異を認め、また FICM において mtDNA の3つの tRNA に変異を認めたことより、心筋症の一因として mtDNA における tRNA の変異が示唆された。

---

**Key words** mitochondrial DNA, nucleotide sequence, mitochondrial encephalomyopathy, cardiomyopathy

---

Abbreviations: CPEO, chronic progressive external ophthalmoplegia; ddNTP, dideoxynucleoside triphosphate; dNTP, deoxyribonucleoside triphosphate; dATP, deoxyadenoside triphosphate; ddATP, dideoxyadenosine triphosphate; ddCTP, dideoxycytidine triphosphate; ddGTP, dideoxyguanosine triphosphate; ddTTP, dideoxythymidine

ミトコンドリア DNA (mitochondrial deoxyribonucleic acid, mtDNA) は、16,569塩基対よりなる環状二重鎖 DNA であり、ミトコンドリア電子伝達系酵素の13個のサブユニット、22種の tRNA、および2個の rRNA をコードしている<sup>1)</sup>。ミトコンドリア電子伝達系は5種の酵素(複合体 I-V)より形成され、そのうち複合体 II を除く4種の複合体が核の DNA にコードされたサブユニットと mtDNA にコードされたサブユニットで構成されており、核の DNA と mtDNA の二重支配を受けている。

ミトコンドリア脳筋症は、ミトコンドリアのエネルギー代謝異常に伴う、筋萎縮・筋力低下などの筋症状、および知能低下・難聴・視力低下・運動失調などの中枢神経症状を呈する疾患群である<sup>2)</sup>。その一つの臨床疾患単位として脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症 (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes, MELAS) がある<sup>3)</sup>。本症は低身長、知能低下、嘔吐、あるいは半盲・皮質盲などの視覚異常を伴った脳卒中様発作を主症状とし、これらに加えて高乳酸血症、発作に伴った頭部コンピューター断層写真上での低吸収域の出現、生検骨格筋の組織化学におけるミトコンドリアの異常所見により診断される。本症は心筋症を伴うことが多く<sup>4)</sup>、心不全は代謝性アシドーシスとともにその死因として重要である。近年 MELAS においてミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) のサブユニットの欠損が報告された<sup>5,6)</sup>。その後複合体 I だけでなく、複合体 III, IV, V のサブユニットにも軽度ながら欠損が見いだされたが、核の DNA のみでコードされた複合体 II は正常範囲であった<sup>7)</sup>。さらに本症では母系遺伝の報告があり<sup>8,9)</sup>、mtDNA は母系遺伝をするので<sup>10)</sup> mtDNA の変異にその原因が求められた。しかし、MELAS の患者の mtDNA には大きな欠失は認められず<sup>11)</sup>、小さな欠失ないし点変異が原因と推定された。そのため MELAS の患者の mtDNA の全塩基配列を決定する必要がある。

従来のシーケンス法は、ラジオアイソトープを用いること、プラスミド、あるいはファージへのクローニングを要することなどより、長い DNA の全塩基配列決定には数カ月の期間を要した<sup>12)</sup>。これらの欠点を克服するため、蛍光法を用いた全自動 DNA 解析装

置<sup>13-15)</sup>と、複製酵素連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR)<sup>16,17)</sup>を用いた直接塩基配列決定法を組み合わせたシステムを開発し mtDNA 全塩基配列の迅速な決定を行うことを可能とした。このシステムを用い、典型的な MELAS 2例とその重症型と考えられる乳児致死型心筋症1例の mtDNA 全塩基配列を決定した。

## 対象および方法

### I. 症 例

患者 1 (P1): 18才女性。頭痛、嘔吐を主訴として入院した。頭部コンピューター断層写真で頭頂後頭葉に低吸収域を認めた。低身長、知能低下、痙攣発作、筋力低下、繰り返す嘔吐、片麻痺、半盲、乳酸アシドーシスを呈し、糖尿病(インスリン20単位/日)、および肥大型心筋症を伴っていた(図1)。20才で心不全のため

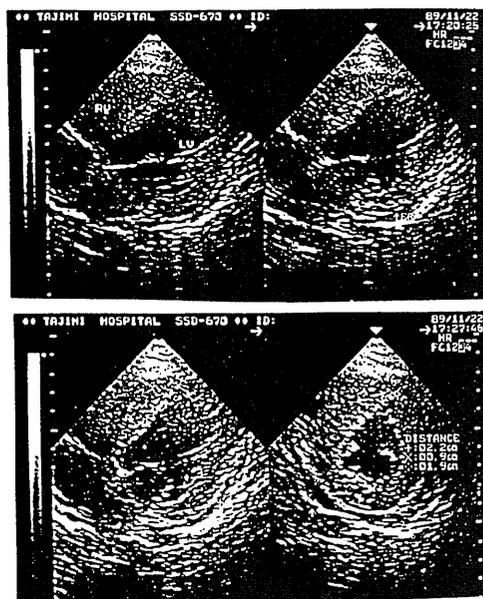


Fig. 1. Two-dimensional echocardiogram of Patient 1. Top, Apical four-chamber view, obtained in end-diastole (left) and in end-systole (right) demonstrated reduced myocardial contractility. Bottom, Left panel showed another apical four-chamber view. Short axis view (right) revealed that the thickness of the left ventricular free wall was 19mm and mild pericardial effusion.

triphosphate; FICM, fatal infantile cardimyopathy; MELAS, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; MERRF, myoclonus epilepsy with ragged-red fibers; mtDNA, mitochondrial DNA; PCR, polymerase chain reaction

Table 1. Enzymic activities of the respiratory chain in the heart mitochondria of Patient 1 and in the skeletal muscle mitochondria of Patient 2

	Patient 1	Patient 2	Control	Range
NADH-cytochrome c reductase	45	14	249±174	82±637
Succinate-cytochrome c reductase	1719	1000	889±507	343±1767
Cytochrome c oxidase	1465	708	1554±753	601±2873

Activities are expressed in nmol/min/mg of mitochondrial protein.

\* Values are mean±S.D.

Table 2. Enzyme activities in heart mitochondria of Patient 3

Enzyme	Patient (%)	Control* (n)	Range
Complex I	213 (31)	690±267 (3)	482-994
Complex II	1866 (309)	604±98 (3)	537-716
Complex III	1119 (154)	728±223 (3)	487-931
Complex IV	197 (33)	593±122 (3)	458-697
Complex V	106 (80)	133±42 (3)	99-179

Activities are expressed in nmol/min/mg of mitochondrial protein.

\* Values are mean±S.D.

死亡した。

患者2 (P2): 13才男性。低身長, 知能低下, 痙攣発作, 筋力低下, 繰り返す嘔吐, 片麻痺, 皮質盲, 乳酸アシドーシスを呈し, 肥大型心筋症を伴っていた。15才で突然死した。

両症例ともに筋生検で虫食い状赤染線維 (ragged-red fiber) を認めた。神経・筋疾患および心疾患の家族歴はともに認められなかった。また骨格筋より単離したミトコンドリアの NADH-ubiquinone oxidoreductase 活性は患者1, 2ともに低下していた (表1)。

患者3 (P3): 1才男児。全身衰弱のため入院。患児には兄弟はなく, 両親に血族結婚も見られなかった。胸部エックス線写真では著明な心拡大を認めた。髄液検査施行中に心停止を引き起こしたが, 10分後に蘇生した。貧血, 代謝性アシドーシス, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), lactate dehydrogenase (LDH), creatine phosphokinase (CPK) 値の上昇を認めた。心電図では散発性の心室性期外収縮が見られた。繰り返す痙攣発作とともに徐脈化が進行し, 第7病日に死亡した。剖検では心重量 145g (コントロール 42g) で左心室は著明な肥大と拡張を呈した。炎症細胞の浸潤は見られなかったが, 個々の心筋細胞は腫大し

ていた。心筋より単離したミトコンドリアにおいて複合体 I, IVの活性の著明な低下, 複合体 Vの活性の軽度の低下が見られた (表2)。

## II. 方法

### 1. 原理 (図2)

PCR法で一次増幅された DNA を鋳型として, 5' 端側に M13mp18 のユニバーサル配列 (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') をもった38塩基のプライマーと, 適度に間隔をあけた20塩基のプライマーとで非対象 PCR<sup>19)</sup> を行ない, 3' 端側に M13mp18 のユニバーサル配列と相補的な配列をもつ一本鎖 DNA を得る。得られた一本鎖 DNA を鋳型として, M13mp18 のユニバーサル配列の 5' 端側に4種の蛍光色素を付けた各色素プライマーを用い, Sanger らのジデオキシ反応<sup>19)</sup> を PCR 法で行なう。つまり A の色素プライマーを伸張させた場合, dideoxyadenosine triphosphate (ddATP) で停止した DNA 鎖が合成される。他の C, G, T の場合も同様である。反応の終了した4種の反応液は一つに集められ, 塩基配列決定用アクリルアミドゲルの1レーンで泳動される。DNA 鎖の長さに応じて泳動されたバンドは自動解析装置で検出される。

### 2. プライマー作製

約300塩基対の間隔で mtDNA の L 鎖, H 鎖それぞれに特異的な配列をもつ20塩基のプライマー (L プライマー, H プライマー) を各60種ずつ作製した。L プライマーは10種の使用した。プライマーは 390B 型 DNA 合成装置 (Applied Biosystems, Foster City, USA) で作製し, オリゴヌクレオチド精製カートリッジ (Applied Biosystems) を用いて精製し, プライマーには次の命名法を用いた。L(n) プライマーは塩基番号 10n+1 から 10n+20 までの L 鎖の塩基配列をもつ20塩基のプライマーをさす。H(n) プライマーは塩基番号 10n+20 から 10n+1 までの H 鎖の塩基配列をもつ

20塩基のプライマーをさす。さらに各 L プライマーの 5' 端側の M13mp18 のユニバーサル配列をつけた38塩基のプライマーを60種作製し、FL(n) プライマーとした。

### 3. 一次増幅

患者1の骨格筋、患者2および患者3の心筋組織から total DNA を抽出した<sup>20</sup>。下記のプライマー対を用い、隣り合うフラグメントが一部重なり合うように、かつ mtDNA 全長をカバーするように10のフラグメントを PCR 法にて増幅した。PCR は、total DNA 10ng, L プライマー 50pmol, H プライマー 50pmol, deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) 各 200  $\mu$  M, *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, USA) 1.25単位, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, および0.01%ゼラチンを含む全量 50  $\mu$  l で行なった。反応は DNA Thermal Cycler

## Fluorescence-based direct sequencing

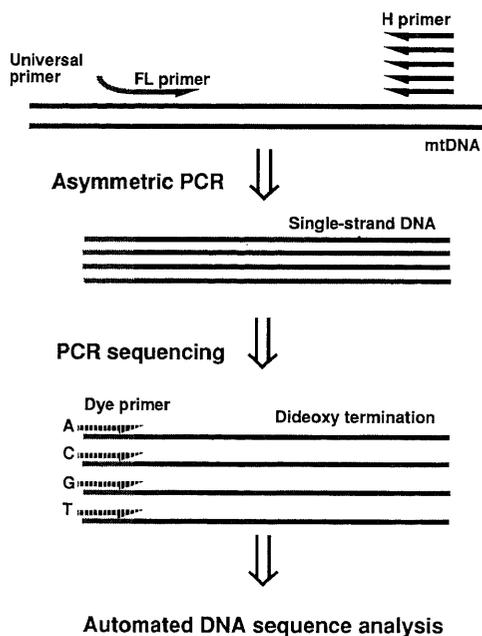


Fig. 2. The principle of fluorescence-based direct sequencing. Asymmetric PCR was conducted using PCR-amplified double-strand DNA fragment, FL primer which contained M13mp18 universal primer, and H primer. 10 cycles of PCR-dideoxy termination reaction were performed using asymmetric PCR-amplified single-strand DNA, dye primer, and deoxy/dideoxy nucleotide mixture.

(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) を用い、熱変性 94°C15秒間、プライマー伸張72°C60秒間を1サイクルとして30サイクル繰り返した。用いたプライマー対は次のとおりである。L1641-H136, L61-H339, L231-H454, L372-H559, L488-H702, L680-H929, L853-H1338, L1250-H1534, L1482-H1619, L1594-H60。

反応終了後、3M 酢酸ナトリウム (pH 7.4) 5  $\mu$  l および100%エタノール 100  $\mu$  l を加え、-70°Cに30分間放置した。13,000g 10分間の遠心の後、上清を除き、沈殿の DNA を70%エタノールでリンスし、真空チェンバー内で乾燥させた。得られたペレットを6  $\mu$  l の蒸留水で溶解した。

### 5. 蛍光色素シークエンス反応

反応には *Taq* シークエンスキット (Applied Biosystems) を用いた。キットには *Taq* DNA polymerase, 5  $\times$  シークエンスバッファー (50mM Tris-HCl, pH 8.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 250mM NaCl), 4種の色素プライマー (FAM, ROX, JOE, TAMRA) および dNTP/dideoxyribonucleoside triphosphate (ddNTP) 混合液が含まれている。蛍光色素が光に脆弱なため、以下の反応はすべて遮光した状態で行なった。調整した一本鎖 DNA を鋳型として、色素プライマーを用いてシークエンス反応を行なった。Dideoxyadenosine triphosphate (ddATP) を含むシークエンス反応では、一本鎖 DNA 溶液 1  $\mu$  l, A (Joe) 色素プライマー 0.2 pmol, doxyadenosine triphosphate (dATP)/ddATP 混合液 1  $\mu$  l, シークエンスバッファー 1  $\mu$  l, *Taq* DNA polymerase 1.25単位を含む全量 7.75  $\mu$  l で PCR 反応を行なった。反応は熱変性 90°C15秒間、アニーリングおよびプライマー伸張 70°C60秒間を10回繰り返した。Dideoxycytidine triphosphate (ddCTP) を含む反応も同様に行なった。Dideoxyguanosine triphosphate (ddGTP), dideoxythymidine triphosphate (ddTTP) を含む反応ではすべて倍量で反応を行なった。4種の反応液は PCR 終了後、3M 酢酸ナトリウム 5  $\mu$  l, 100%エタノール 120  $\mu$  l を含むチューブに集め、反応を停止させた。-20°Cで10分間放置後、13,000g 10分間の遠心を行ない、上清を除き、沈殿を70%エタノールでリンスの後、真空チェンバーで乾燥させた。試料を90°C, 2分間加熱変性させた後、6%アクリルアミドゲルで泳動し、10時間に渡って 373A 自動 DNA 解析装置 (Applied Biosystems) により蛍光の検出を行なった。検出された蛍光は同社ソフトウェアプログラムにより分析され塩基配列のデータに変換された。得られた塩基配列を GENETYX Ver.6.00 (Software Development, 東京) を用い、既報のヒト



の塩基番号10,398における A から G への変異は ND3 のスレオニンをアラニンに変化させていた。このアラニンはヒト<sup>1)</sup>以外のウシ<sup>20)</sup>, ラット<sup>29)</sup>, マウス<sup>30)</sup>で保存されているものであり, コントロールにおいてもアラニンであったことよりその意義は否定的である。一方患者1で ND1 領域(塩基番号 3,391)に, また患者2で ND4 領域(塩基番号 11,553)に, 上記哺乳類で保存されているアミノ酸残基の置換をもたらす変異を認め, これらの変異はコントロールでは認められなかった。有意義な変異である可能性がある。非翻訳領域では(表4), MELAS 2 症例 P1, P2 に共通して塩基番号3,243の tRNA<sup>Lys</sup>(UUR) 遺伝子上の dihydro-uridine (DHU) ループに A から G への塩基転位型突然変異見いだされた(図4, 図5)。この変異は他の2例の MELAS 患者においても検出されたが, 7例の正常者および福原病(myoclonus epilepsy with ragged-red fibers, MERRF) 1例と慢性進行性外眼筋麻痺(chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO) 2例の mtDNA の塩基配列の分析ではこの変異は認められなかった。

患者3(P3)において, アミノ酸変異を伴う変異として CO2 遺伝子の塩基番号7,673に A から G へ,

Cytb 遺伝子の塩基番号14,927に A から G への塩基転位型変異を認められた。これらに対するアミノ酸は哺乳類で保存されているので, これらの変異は有意義である可能性がある。非翻訳領域においてロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号3,254に G から T へ, イソロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号3,254に G から T へ, イソロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号4,317に A から G へ(図6, 図7), およびトリプトファン tRNA 遺伝子上の塩基番号5,554に C から T への変異を認めた。これらのうちイソロイシン tRNA 遺伝子の変異は, マウス以外の哺乳類で保存された塩基の変異であった。一方ロイシン, およびトリプトファン tRNA 遺伝子の変異は, 哺乳類で保存されていない塩基の変異であった。

### 考 察

症例1, 2および3においてミトコンドリア呼吸鎖の複合体 I の活性低下が見られ, その原因として ND 領域の変異による複合体 I のサブユニットの欠損を推定した。しかしながら, mtDNA の変異は正常個体においても多く見られ, 病的変異と正常亜型の区別をすることは容易ではない。そこで典型的な MELAS 2

Table 3. mtDNA mutations causing amino acid replacements

Nt	Region	Nucleotide					Amino acid							
		P1	P2	P3	C	Anderson <sup>1)</sup>	P1	P2	P3	C	Anderson	Bovine <sup>20)</sup>	Mouse <sup>29)</sup>	Rat <sup>30)</sup>
3391	ND1	A	G	G	nd	G	S	G	G	nd	G	G	G	G
4216	ND1	T	T	C	T	T	Y	Y	H	Y	Y	H	H	Y
4833	ND2	A	G	A	A	A	T	A	T	T	T	I	I	I
5178	ND2	A	C	A	A	C	M	L	M	M	L	T	T	T
5301	ND2	A	A	G	A	A	I	I	V	I	I	L	M	L
5442	ND2	T	T	C	T	T	F	F	L	F	F	F	M	I
7129	CO1	A	A	G	A	A	Y	Y	C	Y	Y	W	W	W
7673	CO2	A	A	G	A	A	I	I	V	I	I	I	I	I
8414	ATP8	T	C	C	T	C	F	L	L	F	L	F	M	M
8701	ATP6	G	G	G	G	A	A	A	A	A	T	S	L	L
8860	ATP6	G	G	G	G	A	A	A	A	A	T	A	A	A
9559	CO3	C	C	C	C	G	P	P	P	P	R	P	P	P
10398	ND3	G	G	G	G	A	A	A	A	A	T	A	A	A
11447	ND4	G	G	G	G	C	V	V	V	V	L	V	V	I
11553	ND4	C	G	C	C	C	S	C	S	S	S	S	S	S
13702	ND5	C	C	C	nd	G	R	R	R	nd	G	R	R	R
14199	ND6	T	T	T	T	G	T	T	T	T	P	W	R	R
14272	ND6	C	C	C	C	G	L	L	L	L	F	G	M	M
14368	ND6	C	C	C	C	G	L	L	L	L	F	F	L	V
14927	Cytb	A	A	G	A	A	T	T	A	T	T	T	T	T
15326	Cytb	G	G	G	G	A	A	A	A	A	T	M	I	I
15737	Cytb	G	G	A	G	G	D	D	N	D	D	D	N	N

Nt, Nucleotide number; P1, Patient 1; P2, Patient 2, P3, Patient 3; C, Control; nd, not determined.

Table 4. mtDNA mutations of the non-coding regions

Nt	Region	P1	P2	P3	Control	Anderson
73	D-loop	G	G	G	G	A
150	D-loop	C	C	T	C	C
151	D-loop	C	C	T	C	C
152	D-loop	T	C	C	T	T
191.1	D-loop	A			A	
194		T	C	C	T	C
199		C	T	T	C	T
207		A	G	G	A	G
215		A	G	A	A	A
263		G	G	G	G	A
303.1		C		C		
303.2				C		
311.1		C	C	C		
489		C	C	C	C	T
709	12SrRNA	G	A	G	A	A
750	12SrRNA	G	G	G	G	A
1106	12SrRNA	T	T	C	T	T
1438	12SrRNA	G	G	G	G	A
2270	16SrRNA	C	A	A	A	A
2706	16SrRNA	G	G	G	nd	A
2766	16SrRNA	T	C	C	nd	C
3010	16SrRNA	A	G	G	nd	G
3106	16SrRNA	—	—	—	nd	C
3243	tRNA-Leu	G	G	A	nd	A
3254	tRNA-Leu	C	C	T	nd	C
4317	tRNA-Ile	A	A	G	A	A
5554	tRNA-Trp	C	C	T	C	C
5601	tRNA-Ala	C	T	C	C	C
16184.1	D-loop			C		
16189	D-loop	T	C	T	T	T
16190.1	D-loop			C		
16193	D-loop	T	C	C	C	C
16194	D-loop	A	G	A	A	A
16195	D-loop	T	G	T	T	T
16197	D-loop	C	G	C	C	C
16223	D-loop	C	T	T	C	C
16245	D-loop	T	C	C	T	C
16256	D-loop	C	T	C	C	C
16278	D-loop	C	T	C	C	C
16311	D-loop	T	T	C	T	T
16316	D-loop	A	A	G	A	A
16362	D-loop	C	C	C	C	T
16519	D-loop	T	C	T	T	T

Nt, Nucleotide number; P1, Patient 1; P2, Patient 2; P3, Patient 3; C, Control; D-loop, Displacement loop; n.d., not determined; —, deletion; 191.1, 303.1, 303.2, 311.1, 16184.1 and 16190.1 denote insertions.

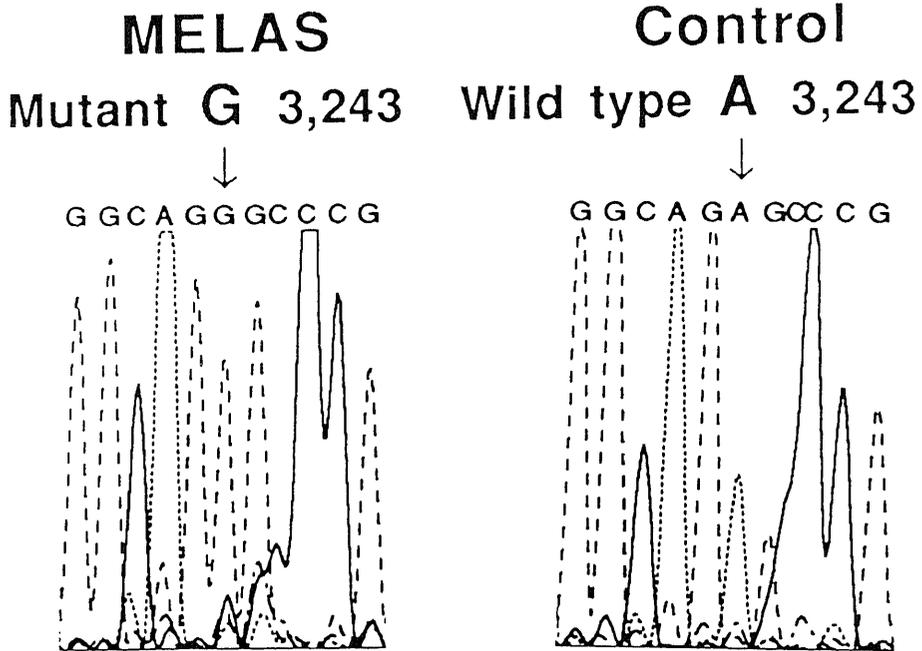


Fig. 4. A-to-G transition at nucleotide number 3,243 in MELAS. Left, A-to-G transition at nucleotide number 3,243 in MELAS. Right, the sequence of a normal control.

Mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)

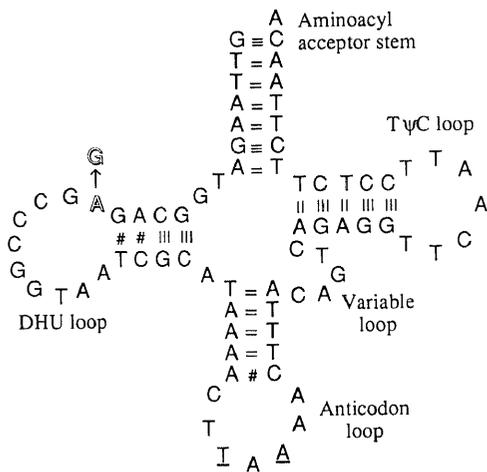


Fig. 5. A-to-G transition at 5' end of the dihydrouridine loop of mitochondrial leucine tRNA (UUR). A at 5' end of dihydrouridine loop was mutated to G in MELAS.

Mutation in tRNA<sup>Ile</sup>

Rat	TAATAGAGGT	TAAATCCTC	TTATTCTA
Mouse	TTATAGAGGT	TCAAGCCCTC	TTATTCTA
Bovine	TAATAGAGGT	TCAAACCCCTC	TTATTCTA
Human	TAATAGGAGC	TTAAACCCCTC	TTATTCTA
Patient	TAATAGGAGC	TTAAGCCCTC	TTATTCTA

↑  
4,317

T A A T A G G A G C T T A A G C C C C T T A T T C T A

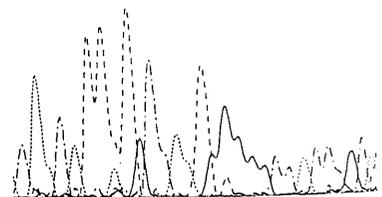


Fig. 6. A-to-G transition of mitochondrial isoleucine tRNA at nucleotide number 4,317. A at 4,317 is conserved in man, cow, and rat, but not mouse.

症例に共通な変異に注目した。MELAS 2 症例全塩基配列を決定したところ、この 2 症例に共通して認められ、かつコントロールに見られなかった変異はロイシン tRNA (UUR) 遺伝子上の塩基番号3,243での A から G への塩基転位型変異のみであった<sup>31,32)</sup>。この A 塩基はヒト、ウシ、マウス、ラットの他、ニワトリ<sup>33)</sup>、カエル<sup>34)</sup>、ウニ<sup>35,36)</sup>、およびショウジョウバエ<sup>37)</sup>まで保存されており (図 8)、この A 塩基はロイシン tRNA (UUR) 分子の機能の重要な部位と想定され、この A 塩基の G 塩基への変異がロイシン tRNA (UUR) 分子の機能に大きく影響を及ぼすことが考えられた。

さらに大腸菌において、tRNA 遺伝子の DHU ループおよび TΨC ループの 4 塩基によって構成される "variable pocket" が tRNA それぞれに特異的な

aminoacyl-tRNA synthetase の特異性認識部位となっており、その 4 塩基の変異が特異性を損なうと報告された<sup>38)</sup>。塩基の種間保存の問題だけでなく DHU ループあるいは TΨC ループの変異による aminoacyl-tRNA synthetase の特異性の変化が、tRNA 分子の機能に影響を与えている可能性もある。

ロイシン tRNA (UUR) 遺伝子上の塩基番号3,243での A から G への塩基転位型変異により制限酵素 *Apa* I の認識部位が新たに形成される。ロイシン tRNA (UUR) 遺伝子の点変異および制限酵素 *Apa* I の本来の認識部位を含む塩基番号2,881から4,560までを PCR 法にて増幅し、制限酵素 *Apa* I による消化を行った。塩基番号4,427の制限酵素 *Apa* I の本来の認識部位での切断が完全に行われたにもかかわらず、

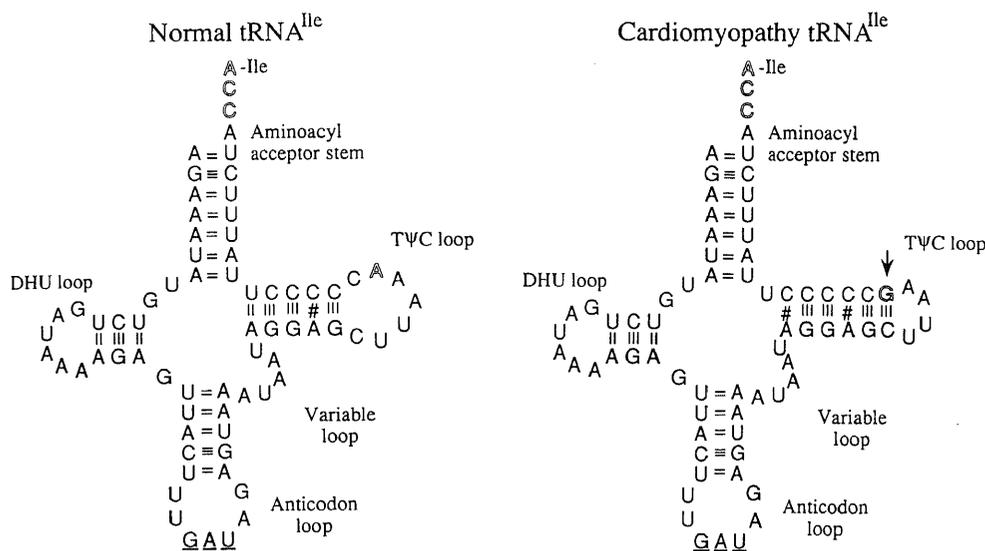


Fig. 7. A-to-G transition of the TΨC loop of mitochondrial isoleucine tRNA. Left, normal isoleucine tRNA conformation. Right, A-to-G transition might alter the pairing of the stem of TΨC loop.

Transition to G of evolutionally conserved A at the 5' End of DHU Loop of tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) in MELAS

	Aminoacyl stem	DHU stem	DHU loop	DHU stem	Anticodon stem	Anticodon loop	Anticodon stem	Variable loop	TΨC stem	TΨC loop	TΨC stem	Aminoacyl stem	
MELAS			G										
Human	GTTAAGA	TG	GCAG	AGCCCCGTTAA	TCGC	A TAAAA	CTTAAA	CTTTA	CAGTC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	TCTTAACA
Bovine	GTTAAGG	TG	GCAG	AGCCCCGTTAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAC	TTTTA	TATCC	AGAGA	TTCAAAAT	CCTCT	CCTTAACA
Mouse	ATTAGGG	TG	GCAG	AGCCAGGAAA	TTGC	G TAAGA	CTTAAA	CCTTG	TTCCC	AGAGG	TTCAAAAT	CCTCT	CCCTAATA
Rat	ATTAGGG	TG	GCAG	AGCCAAGTAA	TTGC	G TAAGA	CTTAAA	CCTTG	TTCCC	AGAGG	TTCAAAAT	CCTCT	CCCTAATA
Chicken	GCTAGCG	TG	GCAG	AGCTCGGCAA	ATGC	A AAAGG	CTTAAGC	CCTTT	AT-CC	AGAGG	TTCAAAAT	CCTCT	CCCTAGCT
Xenopus	GCTAGCG	TG	GCAG	AGCCTGGCTA	ATGC	A AAAGG	CCTAAGC	TCTTT	TTATC	AGGGG	TTCAAAAT	CCCTT	CGCTAACT
Urchin (S.p.)	GCTAAGG	TA	GCAA	AG--TGTTA	ATGC	A GAAGG	CCTAAGA	CCTTC	CTATC	AAAGG	TTCAACT	CCCTT	CTTTAGCT
Urchin (P.L.)	ACTAAA	TA	GCAA	AG--TGTTA	ATGC	A GAAGG	CCTAAGA	CCTTC	CTACA	AAAGT	TTCAACT	CCCTT	TTTTAGCT
Drosophila	TCTAATA	TG	GCAG	AT-TAGTGCA	ATGC	A ATGGA	TATAAGC	TCCAT	----	AAA-G	TATTATT	C-TTT	TATTAGAA

Fig. 8. Comparison of mitochondrial leucine tRNA (UUR) among various species. A at 5' end of the dihydrouridine loop of mitochondrial leucine tRNA is strictly conserved in man, cow, mouse, rat, chicken, *Xenopus*, sea urchin, and *Drosophila*. S. P., *Strongylocentrotus purpuratus*; P. L., *Paracentrotus lividus*.

1,551bp の断片は消失せず、不完全切断された1,185bp, 366bp の断片と混在していた。このことより変異ロイシン tRNA (UUR) は野生型と変異型が混在するヘテロプラスミーの状態で存在することがわかった (図9)。患者1, 2の各臓器より抽出した mtDNA の制限酵素 *ApaI* による消化では、いずれの臓器でもロイシン tRNA (UUR) 遺伝子は、ヘテロプラスミーの状態に存在した。再生能力のない神経・筋組織における変異 mtDNA の占める割合と同等またはそれ以上の変異 mtDNA が肝臓、腎臓、膵臓にみられた。

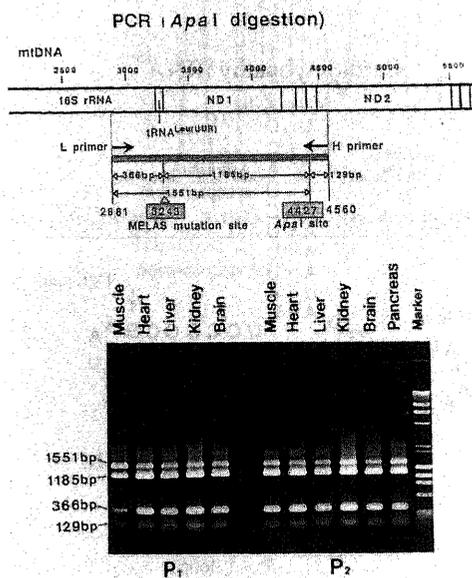


Fig. 9. Digestion with restriction endonuclease *ApaI* of PCR-amplified mtDNA fragment of various tissues of Patients 1 and 2. mtDNA fragments encompassing nucleotide positions 2,881 to 4,560 were amplified, and digested with restriction endonuclease *ApaI*. 129bp and 1,551bp fragments were generated by cleavage at nucleotide position 4,427 of the normal *ApaI* recognition site. 1,158bp and 366bp fragments were generated by cleavage at nucleotide position 3,245 when A-to-G transition occurred at 3,243. Even though sufficient *ApaI* was present and overnight digestion was performed, 1,551bp fragment could not be digested completely. The mutated mtDNA in MELAS, therefore, coexisted with wild type mtDNA, in the state of heteroplasmy. P1, Patient1; P2, Patient2.

にもかかわらずそれらの臓器が不全状態に至らないのは、変異 mtDNA の占める割合と臓器ごとの発症の閾値との関連が示唆された。

また、患者2のアラニン tRNA の TΨC ループに C から T への塩基転位型変異があり、この C 塩基は哺乳類で保存されていた。MELAS 症候群にこの変異をもつサブグループがあるのか今後の検索が必要であろう。

一方、この2症例でそれぞれに特異的で、かつ種間保存の高いアミノ酸の置換をもたらす変異が ND 領域に認められた。しかし、コントロール2例ではこのような変異は認められなかった。種間保存の高いアミノ酸の置換をもたらす変異は、MELAS における酵素活性の低下になんらかの関わりを持ち、置換されたアミノ酸残基の種類によっては機能的な変化をもたらす可能性があると考えられる。

複合体 I の欠損症の最重症型として乳児致死型に分類される一群がある。思春期で発症する典型的な MELAS と異なり、ほとんどが1才未満で死亡する。患者3において CO2 領域 (塩基番号 7,673) および *Cytb* 領域 (塩基番号 14,927) での種間保存の高いアミノ酸の置換をもたらす変異が見いだされた。また非翻訳領域では tRNA 遺伝子上に3つの変異が見いだされた。そのうちの1つは哺乳類で保存されていた<sup>39)</sup>。典型的な MELAS とは異なる変異であるが、tRNA 遺伝子に変異を持っていることより、心筋症の一因となる可能性が示唆された。MERRF においてもリジン tRNA 遺伝子の変異が見いだされていること<sup>40)41)</sup>、また CPEO あるいは Kearns-Sayre syndrome (KSS) における mtDNA の欠失<sup>42-44)</sup>においても、欠失領域における tRNA 遺伝子の欠損が病因であるとする考え方もあり、ミトコンドリア脳筋症の三大臨床疾患単位が tRNA 遺伝子の欠失ないし変異に基づいていることも考えられる。点変異にともなう tRNA 分子の変化が、いかなる機序により発症に結びつくかは今後の課題である。

本研究において、蛍光法を用いた16,569塩基対の全ミトコンドリア遺伝子の塩基配列決定システムを確立した。このシステムを用いることにより一回の電気泳動の際に24個の試料を泳動でき、1試料あたり350から450塩基対を読むことができるため、3回の泳動で全長を読むことができ、数日で1症例の mtDNA の変異の解析を完了することが可能であった。また、ヘテロプラスミーであったにもかかわらず、直接塩基決定法を用いたため、クローニングによるシークエンスを行った際の変異の見逃しを防ぐことができた。しかし

変異 mtDNA の少ない血液試料のような場合、変異塩基のシグナルが低く検出不能となることが予想される。

### 結 論

蛍光色素を用いた自動解析装置により mtDNA 全長 16,569塩基の塩基配列を決定した。典型的な MELAS 2 症例に共通して、mtDNA のロイシン tRNA (UUR) 遺伝子に変異を認めた。さらに症例ごとに特異的に種間保存の高いアミノ酸残基の置換をともなう変異が ND 領域に見られた。同様に FICM でも、CO2, Cytb 遺伝子の点突然変異の他に、ロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号3,254に G から T へ、イソロイシン tRNA 遺伝子上の塩基番号4,317に A から G へ、およびトリプトファン tRNA 遺伝子上の塩基番号5,554に C から T への変異が見いだされた。

### 謝 辞

稿を終えるに望み、御指導、御校閲を賜った恩師金沢大学第2内科竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します。また本研究の機会を与えて頂き、終始御指導、御教示を頂いた名古屋大学第2生化学教室小澤高将教授、田中雅嗣助手に心から感謝いたします。また御指導、御教示を頂いた金沢大学第2内科清水賢己講師および金沢大学第2内科循環器班の諸先生方に感謝いたします。

### 文 献

- 1) Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R. & Young, I. G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465 (1981).
- 2) Di Mauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., Nakagawa, M. & De Vivo, D. C.: Mitochondrial myopathies. *Ann. Neurol.*, **17**, 521-538 (1985).
- 3) Pavlakis, S. G., Phillips, P. C., Di Mauro, S., De-Vivo, D. C. & Rowland, L. P.: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann. Neurol.*, **16**, 481-488 (1984).
- 4) Nishizawa, M., Tanaka, K., Shinozawa, K., Kuwabara, T., Atsumi, T., Miyatake, T. & Ohama, E.: A mitochondrial encephalomyopathy with cardiomyopathy. A case revealing a defect of complex I in the respiratory chain. *J. Neurol. Sci.*,

**78**, 189-201 (1987).

5) Tanaka, M., Nishikimi, M., Suzuki, H., Ozawa, T., Nishizawa, M., Tanaka, K., & Miyatake, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140**, 88-93 (1986).

6) Ichiki, T., Tanaka, M., Nishikimi, M., Suzuki, H., Ozawa, T., Kobayashi, M. & Wada, Y.: Deficiency of subunits of Complex I and mitochondrial encephalomyopathy. *Ann. Neurol.*, **23**, 287-294 (1988).

7) Yoneda, M., Tanaka, M., Nishikimi, M., Suzuki, H., Tanaka, K., Nishizawa, M., Atsumi, T., Ohama, E., Horai, S., Ikuta, F., Miyatake, T. & Ozawa, T.: Pleiotropic molecular defects in energy-transducing complexes in mitochondrial encephalomyopathy (MELAS). *J. Neurol. Sci.*, **92**, 143-158 (1989).

8) Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. & Wallace, D. C.: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6715-6719 (1980).

9) Montagna, P., Gallassi, R., Medori, R., Govoni, E., Zeviani, M., Di Mauro, S. & Lugaresi, E.: MELAS syndrome: Characteristic migrainous and epileptic features and maternal transmission. *Neurology*, **38**, 751-754 (1998).

10) Lombes, A., Bonilla, E. & Di Mauro, S.: Mitochondrial encephalomyopathies. *Rev. Neurol. Paris.*, **145**, 671-689 (1989).

11) Yoneda, M., Tanaka, M., Nishikimi, M., Suzuki, H., Tanaka, K., Nishizawa, M., Atsumi, T., Ohama, E., Horai, S., Ikuta, F., Miyatake, T. & Ozawa, T.: Pleiotropic molecular defects in energy-transducing complexes in mitochondrial encephalomyopathy (MELAS). *J. Neurol. Sci.*, **92**, 143-158 (1989).

12) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977).

13) Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A. & Baumeister K.: A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, **238**, 336-341 (1987).

14) Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J.,

- Hughes, P., Dodd, L. E.: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, **321**, 674-679 (1986).
- 15) Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. & Zenke, M.: Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4593-4602 (1987).
- 16) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491 (1988).
- 17) Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H. & Brow, M. A. D.: DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9436-9440 (1988).
- 18) Gyllensten, U. B. & Erlich, H. A.: Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7652-7656 (1988).
- 19) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977).
- 20) Drouin, J.: Cloning of human mitochondrial DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **140**, 15-34 (1980).
- 21) Bookelman, H., Trijbels, J. M. F., Sengers, R. C. A. & Janssen, A. J. M.: Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria, isolated from fresh and frozen stored muscle specimens. *Biochem. Med.*, **19**, 366-373 (1978).
- 22) Sottocasa, G. L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. & Bergstrand, A.: An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.*, **32**, 415-438 (1967).
- 23) Cooperstein, S. J. & Lazarow, A.: A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.*, **189**, 665-670 (1951).
- 24) Hatefi, Y. & Rieske, J. S.: Preparation and properties of DPNH-coenzyme Q reductase (Complex I of the respiratory chain). *Methods Enzymol.*, **10**, 235-239 (1967).
- 25) Hatefi, Y. & Stiggall, D. L.: Preparation and properties of succinate: ubiquinone oxidoreductase (Complex II). *Methods Enzymol.*, **53**, 21-27 (1978).
- 26) Shimomura, Y., Nishikimi, M. & Ozawa, T.: Isolation and reconstitution of the iron-sulfur protein in ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex. *J. Biol. Chem.*, **259**, 14059-14063 (1984).
- 27) Adam, H.: Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymic Analysis*, 2nd ed. p573-577, Academic Press, New York, 1965.
- 28) Anderson, S., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Eperon, I. C., Sanger, F. & Young, I. G.: Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.*, **156**, 683-717 (1982).
- 29) Bibb, M. J., Van Etten, R. A., Wright, C. T., Walberg, M. W. & Clayton, D. A.: Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, **26**, 167-180 (1981).
- 30) Gadaleta, G., Pepe, G., De Candia, G., Quagliariello, C., Sbisà, E. & Saccone, C.: The complete nucleotide sequence of the *rattus norvegicus* mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J. Mol. Evol.*, **28**, 497-516 (1989).
- 31) Ino, H., Tanaka, M., Ohno, K., Hattori, K., Ikebe, S., Sano, T., Ozawa, T., Ichiki, T., Kobayashi, M. & Wada, Y.: Mitochondrial leucine tRNA mutation in a mitochondrial encephalomyopathy. *Lancet*, **337**, 234-235 (1991).
- 32) Tanaka, M., Ino, H., Ohno, K., Ohbayashi, T., Ikebe, S., Sano, T., Ichiki, T., Kobayashi, M., Wada, Y. & Ozawa, T.: Mitochondrial DNA mutations in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**, 861-868 (1991).
- 33) Desjardins, P. & Morais, R.: Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *J. Mol. Biol.*, **212**, 599-634 (1990).
- 34) Roe, B. A., Ma, D. P., Wilson, R. K. & Wong, J. F. H.: The complete nucleotide sequence

- of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. J. Biol. Chem., **260**, 9759-9774 (1985).
- 35) Cantatore, P., Roberti, M., Rainaldi, G., Gadaleta, M. W. & Saccone, C.: The complete nucleotide sequence, gene organization, and genetic code of the mitochondrial genome of *Paracentrotus lividus*. J. Biol. Chem., **264**, 10965-10975 (1989).
- 36) Jacobs, H. T., Elliott, D. J., Veerabhadra-charya, B. M. & Farquharson, A.: Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. J. Mol. Biol., **202**, 185-217 (1988).
- 37) Clary, D. O. & Wolstenholme, D. R.: The drosophila mitochondrial genome. J. Mol. Evol. **22**, 252-271 (1985).
- 38) McClain, W. H. & Foss, K.: Changing the acceptor identity of a transfer RNA by altering nucleotides in a "variable pocket". Science **241**, 1804-1807 (1988).
- 39) Tanaka, M., Ino, H., Ohno, K., Hattori, K., Sato, W., Ozawa, T., Tanaka, T. & Itoyama, S.: Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomyopathy. Lancet, **336**, 1452 (1990).
- 40) Shoffner, J. M., Lott, M. T., Lezza, A. M. S., Seibel, P., Ballinger, S. W. & Wallace, D. C.: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. Cell, **61**, 931-937 (1990).
- 41) Yoneda, M., Tanno, S., Horai, S., Ozawa, T., Miyatake, T. & Tsuji, S.: A common mitochondrial DNA mutation in the t-RNA<sup>Lys</sup> of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. Biochem. Int., **27**, 789-796 (1990).
- 42) Moraes, C. T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A. F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L. C., Servidei, S., Nonaka, I., Koga, Y., Spiro, A., Brownell, K. W., Schmidt, B., Schotland, D. L., Zupanc, M., DeVivo, D. C., Schon, E. A. & Rowland, L. P.: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N. Engl. J. Med., **320**, 1293-1299 (1989).
- 43) Holt, I. J., Harding, A. E. & Morgan-Hughes, J. A.: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. Nature. **331**, 717-719 (1988).
- 44) Ozawa, T., Yoneda, M., Tanaka, M., Ohno, K., Sato, W., Suzuki, H., Nishikimi, M., Yamamoto, M., Nonaka, I. & Horai, S.: Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family with mitochondrial myopathy. Biochem. Biophys. Res. Commun., **154**, 1240-1247 (1988).

**Mitochondrial DNA Point Mutations in Patients with Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes, and Fatal Infantile Cardiomyopathy**  
Hidekazu Ino, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. J. J. Med. Soc., **100**, 883-896 (1991)

**Key words** mitochondrial DNA, nucleotide sequence, mitochondrial encephalomyopathy, cardiomyopathy

**Abstract**

Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) is often associated with cardiomyopathy, and heart failure as well as lactic acidosis is a major cause of death. Complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) was recently reported to be defective in MELAS, and mutations of mitochondrial DNA (mtDNA) were sought as the cause. In this study, the entire sequences of mtDNA of two patients with typical MELAS and cardiomyopathy, and one patient with fatal infantile cardiomyopathy (FICM) were determined using the automated fluorescence-based direct sequencing method. An A-to G transition at nucleotide position 3,243 in the

leucine tRNA gene was common between two typical MELAS patients. Unique mutations in FICM included G-to-T transversion at 3,254 in the leucine tRNA gene, A-to-G transition at 4,317 in the isoleucine tRNA gene, and C-to-T transition at 5,554 in the tryptophan tRNA gene. Among these mutations, A at 3,243 in the leucine tRNA gene and A at 4,317 in the isoleucine tRNA gene are conserved in the man, cow and rat. A at 3,243 in the leucine tRNA gene is further conserved in the mouse chicken, *Xenopus*, sea urchin, and *Drosophila*. These sites are, therefore, important for the function of the tRNA molecule, and these mutations may alter the secondary structure of the tRNA molecule and reduce energy production due to deficiency of mitochondrial protein. The A-to-G transition at 3,243 in the leucine tRNA gene creates a new recognition sequence of restriction endonuclease *ApaI*. Digestion with *ApaI* revealed the same mutation in another two patients with typical MELAS, but not in two patients with chronic progressive ophthalmoplegia (CPEO) or in one patient with myoclonus epilepsy with ragged-red fibers (MERRF). The common mutation in the leucine tRNA gene in two typical patients with MELAS and cardiomyopathy, and three unique mutations in the tRNA genes in one patient with FICM suggested that mutations in the mitochondrial tRNA gene are responsible for the pathogenesis of the cardiomyopathy.