〔シンポジウム：遺伝子を追う〕

ミトコンドリア遺伝子異常と疾患

桃井 真里子

SUMMARY

Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) have been identified in some subgroups of mitochondrial encephalomyopathies: a point mutation in diseases with multisystem involvements and a long deletion of various lengths in diseases associated with external ophthalmoplegia. We have identified a point mutation in mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in a subgroup called MELAS, and found that the protein synthesis in mitochondria was affected in cells where the mutant mtDNA was dominant. The quantitative analyses of the mutant mtDNA in family members of the patients revealed that the mutant mtDNA was maternally inherited and dominantly amplified through generations, although the mechanisms of the dominance is not known. Also, the quantitation of the mutant mtDNA in one cell by PCR amplification revealed that each cell was heteroplasmic with the wild-type and mutant mtDNA. The accumulated evidences suggest that the major factors that determine the clinical features of mitochondrial diseases are the amount of the mutant mtDNA in cells and the ages of the individuals who has the mutant mtDNAs.

Key words: mitochondrial diseases, mitochondrial DNA, mitochondrial encephalomyopathies, MELAS.

はじめに

1988年に初めて視神経萎縮症の家系にミトコンドリア DNA (mtDNA) の塩基置換が報告されて以来¹⁾ミトコンドリア遺伝子変異に起因すると考えられる疾患の報告が相次ぎ、総称としてミトコンドリア異常症と呼ばれるに至っている。われわれの研究経過をたどりながら、核遺伝子支配疾患とは異なる遺伝病であるミトコンドリア異常症の特徴を記述する。

ミトコンドリア DNA の構造と特徴

細胞質内のミトコンドリア内に局在する mtDNA は核遺伝子と異なる特徴を有し、それらが、mtDNA 変異に起因する疾患の特異点の背景となっている。その特徴とは、①16,569塩基対の環状 DNA であり、細胞内に数千コピー存在する、②クロマチン構造をもたず、DNA のみで存在する(損傷を受けやすい)、③介在配列をもたず、転写は1連の DNA に読みとられた後、tRNA 遺伝子の前後で切断されて修飾後、各 RNA となる。この際、tRNA 遺伝子は本来の tRNA 遺伝子としての機能

Mitochondrial DNA mutations and diseases.

Mariko Momoi; 自治医科大学小児科

Correspondence address: Mariko Momoi, Department of Pediatrics, Jichi Medical School, 3311-1, Yakusiji, Minamikawachi, Tochigi 329-04, Japan.

第43回電気泳動学会春季大会シンポジウム

Abbreviations: MELAS, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes; MERRF, myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers; LHON, Leber's hereditary optic neuropathy, NARP, neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa; CPEO, chronic progressive external ophthalmoplegia; KSS, Kearns-Sayre syndrome.

のほかに、転写、RNA のプロセッシングに関する情報をもつ、④大部分は母親由来の DNA である。また、ヒト mtDNA の全塩基配列は 1981 年に Anderson らにより解析され²⁾、現在ではすべての領域が何に対応するかが判明している。電子伝達系酵素群は多数のサブユニットから成り、一部が mtDNA にコードされ、残りは核 DNA にコードされる。これらサブユニットをコードする領域は 13 カ所、rRNA は 2 カ所、その間は 22 個の tRNA 遺伝子で埋められている。mtDNA は核 DNA に比して突然変異率が約 10 倍速く、個体間では平均 0.4% の塩基配列の差がみられる。この差は、人種ではさらに広がるため、人類学的な研究に mtDNA が使われるゆえである。

MELAS の病態解析

MELAS は 1984 年、mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes という名称で疾患単位として確立した³⁾。知能障害、てんかん発作、失調、難聴、低身長、筋力低下などのほかに、脳梗塞様の発作を反復するのを特徴とする。高乳酸血症、骨格筋生検組織で電子伝達系酵素活性の低下が高率にみられることから、ミトコンドリアの機能障害を基盤とする病態が推定されていたが、電子伝達系酵素のうち、2 酵素の活性低下が検出される例があること、一つ

の酵素内でも複数のサブユニット蛋白の欠損が検出されること、が特異点であった。一見して常染色体劣性遺伝と考えられる同胞例があることなどから、責任遺伝子が核遺伝子か mtDNA かは 1989 年まで不明であった。われわれは、患者筋組織が電子伝達系酵素欠損に関してモザイク状を示すことが多いことから、mtDNA 変異の可能性を考えたが、疾患関連 mtDNA の変異を同定するには二つの問題点がある。個体間で DNA 多型の大きい mtDNA の変異が疾患関連と証明する方法、および筋組織は変異形質に関してモザイクであるため、変異の検出が困難であることが予想される点である。われわれは、この 2 点を解決するために、患者 1 個体の筋組織から、われわれが確立した方法で筋細胞をクローン化⁴⁾、正常形質細胞と変異形質細胞を分離する方法論をとった⁵⁾。患者よりクローン化された細胞を複合体 IV (チトクローム酸化酵素、COX と略) 活性で選択し、この 2 者の mtDNA の全塩基配列を決定した^{6,7)}。活性欠損細胞と Anderson らの塩基配列間には 30 カ所の塩基置換があった。そのうち 29 カ所は活性正常細胞にも同様の置換があり、患者と Anderson らの試料の多型であると考えられ、塩基番号 3243 のみ、正常細胞で Anderson と同様の A、活性欠損細胞で G であった。これは、tRNA-Leu (UUR) 遺伝子上の 14 番目の塩基であり、種を越えて保存されていることから、G への置換が病因であ

Fig. 1. A point mutation in mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene.

The left figure shows the two dimensional structure of tRNA-Leu (UUR) gene. "A" at the 14 th base from the 5' end is substituted by "G" in cytochrome c oxidase-deficient cells. The position of the point mutation in the three dimensional structure is shown in the right figure.

ろうと考えられた。tRNA は 3 次元構造では L 字型としており、14 番目の G は 8 番目と水素結合することで L 字構造の固さを保つ塩基の一つであり、その置換は、tRNA-Leu (UUR) の機能を低下させることが予想された (Fig. 1)。

この置換は *Apa* I の認識部位を獲得し、変異 mtDNA は容易に PCR 増幅フラグメントの *Apa* I 切断で検出、定量された。実際、種々の割合の変異 mtDNA を有する筋細胞クローンでは、変異 mtDNA が 88% ではミトコンドリア内蛋白合成は著明に低下せず、96% 以上になると著明に低下した。このことは、変異 mtDNA による細胞障害性は変異遺伝子が 96% 以上であるときに発現するであろうことと、細胞ごとに固有の閾値%が存在するであろうことを推定させた。このことはまた、変異 mtDNA の量が病態発現を規定するという核遺伝子とは、まったく異なる病態が存在することを意味する。1 mtDNA に生じた変異が患者を形成するには変異 mtDNA が正常 mtDNA に比して有意に増幅しているはずである。では、どのように増幅しているのだろうか。変異 mtDNA は全組織に種々の割合で分配されている。剖検組織では、大脳の 96% から、膵臓の 35% にいたる組織ごとに異なる割合の変異 mtDNA が検出された。

病態を発現しない血球細胞でも約 60% 存在する (この割合は症例ごとにかなり異なる)。

患者の両親と同胞のリンパ球における変異 mtDNA の割合は Fig. 3 のようであった^{6,8)}。すなわち、母親には患者より少ない割合の変異 mtDNA が存在し、患者同胞は母親と患者の中間値をとった (Fig. 2)。変異 mtDNA が母系遺伝する事実とともに、継代的に増幅していることを示している。母親のリンパ球に存在する変異 mtDNA は少なくとも母親より以前の代に生じた突然変異を示唆している。変異 mtDNA は正常 mtDNA よりも優位に増幅しつつどのように分配されているのか、を検討するために、リンパ球 1 個をセル・ソーターで採取し、PCR 増幅した mtDNA を解析すると、正常 mtDNA 100% の細胞はなく、変異 mtDNA 70% 付近にピークをなす集団であった⁹⁾。このことは、変異 mtDNA が細胞分裂を反復し分配される過程で優位に増幅しつつだいに変異 mtDNA が多い方へ偏って分布する結果であろうと考えられ、脳においてはこの優位な増幅がより速く進行していると考えられる。点変異を有する mtDNA が正常 mtDNA より優位に増幅する機構の解析はミトコンドリア異常症の患者形成機構の基本であり重要な課題である。われわれの報告後、3243 変異をもたない症例

Fig. 2. The mutant mtDNA in lymphocytes of the family members of the patients with MELAS⁸⁾.

Total DNA was extracted from lymphocytes of family members and the mtDNA fragment containing the 2343 mutation was amplified by using a radiolabeled primer. The mutant mtDNA fragments were digested with endonuclease *Apa* I and the wild-type mtDNA fragments were not. The ratio of the digested and undigested fragments were analyzed by a bioimaging analyzer (BAS 200). Letters in Figure: F, father; M, mother; S, sister; B, brother; P, patient. Numbers in parentheses represent ages of the individual. Parents of Case 4 were not examined because the patient was adopted. Only the patient in Case 5 was negative for 3243 mutation.

に同じく tRNA-Leu (UUR) 遺伝子上の 3271 の塩基置換が報告された。

mtDNA の塩基置換が病因と考えられる その他の病型

MERRF: myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers

ミオクロヌスてんかん, 知能障害, 失調, 難聴, 筋力低下, 低身長などを主徴とし, 1980 年に福原により 1 疾患単位と認識され¹⁰⁾, tRNA-Lys 遺伝子の A-G 置換が病因と報告された¹¹⁾。MELAS とはミオクロヌスてんかん, 脳梗塞様発作において異にする以外は近似点の多い多臓器疾患であり, それがともに tRNA 遺伝子の塩基置換であることは, ミトコンドリア内蛋白合成の広範な障害を共通基盤とするゆえんと考えられる。しかし, tRNA 種の違いが病型の差を生む機構は大きな問題点である。

LHON: Leber's 遺伝性視神経萎縮症

母系遺伝する家系が多いことから, 1988 年に最初に mtDNA の変異が報告された疾患で, 複合体 I のサブユニット 4 (ND 4) 遺伝子上の 11778 の A-G 置換がある¹²⁾。その後, ND 1 の 4160 の T-C 置換¹²⁾, ND 1 の 3460 の G-A 置換¹³⁾など複合体 I 遺伝子上の塩基置換, 複合体 III 遺伝子で唯一 mtDNA 支配であるチトクローム *b* 遺伝子上の 15257 の G-A 置換¹⁴⁾の報告が相次いだ。LHON は患者の 85% が男性であり, 保因者の母親からの発症率も男性 50%, 女性 10% と男性が高い事実があり, mtDNA の塩基置換のみではこれは説明できない点が注目されている。また, 発症者でも血球細胞には塩基置換が検出されない症例があり, 変異遺伝子の組織間分布の症例ごとの差はおおきく, 血球による遺伝子診断が 100% ではない点も核遺伝子疾患とは異なる点である。

NARP: a syndrome with neurogenic muscle weakness, ataxia, retinitis pigmentosa

他病型に比して症例は少なく 1990 年に上記の症候を主とする疾患として確立した。難聴, てんかん, 知能障害などを合併する例もある。ATP 合成酵素のサブユニット 6 遺伝子上, 8993 の T-G 置換が関連遺伝子変異と考えられる¹⁵⁾。この病型において絨毛組織の変異 mtDNA が 100% であったために妊娠を中断し胎児組織の変異 mtDNA を検索したという最初の出生前診断の報告がなされた¹⁶⁾。しかし, 絨毛組織において 30% などという中間の結果の場合の判断法がない以上, 出生前診断が

臨床検査法として確立しうるかどうかは非常に問題であろう。

mtDNA の欠失が病因と考えられる病型

核遺伝子疾患にも塩基置換と欠失があるようにミトコンドリア異常症にも欠失に基づく病型がある。外眼筋麻痺を主症候とする病型で, CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia, 慢性進行性外眼筋麻痺) と呼ばれる。特殊な病型として心伝導障害, 失調などを合併する Kearn-Sayre 症候群 (KSS) が含まれる。1988 年にこれら患者の筋組織, 血球細胞などに種々の範囲の欠失を有する mtDNA が検出された¹⁷⁾。臨床的にも孤発例がほとんどで, かつ欠失 mtDNA も母系遺伝しない。例外的に樹染色体優生遺伝する欠失 mtDNA 保有家系が報告されているが, 大多数の症例では欠失 mtDNA は母親に検出されない。おそらく, 欠失 mtDNA は塩基置換 mtDNA より増幅率の優位さが高く, 卵細胞に生じた欠失が個体を形成する過程で発症するに足りる量となり, かつ, 患者卵細胞は個体形成可能な以上の欠失 mtDNA を有するために保因者が存在せず, 家系を形成しないのであろう。この CPEO とまったく同じ範囲の欠失を有し, まったく異なる病像を呈する Pearson marrow pancreas 症候群^{18,19)}は, 新生児期発症の重症の貧血をはじめとする骨髄機能障害, 脾外分泌不全, 肝機能障害, 腎尿細管障害, 糖尿病, などを呈し, 多くは死に至る。が, まれではあるが, 幼児期に貧血が自然軽快してその後学童期に KSS の病像を呈する症例の報告が相次ぐにいたり²⁰⁾, mtDNA 欠失を病因の基盤とするこれら 2 病型は, 変異 mtDNA の組織間局在と組織障害性が年齢依存性に変化するというミトコンドリア異常症の特異点を示していると考えられるに至った。

mtDNA 変異に基づくと考えられるその他の病型

Table 1 に示すように tRNA-ILeu 遺伝子上の変異に心筋症が報告され, tRNA-Leu (UUR) 遺伝子上の 3260 変異が心筋症とミオパチーを呈する症例に報告された²¹⁾。mtDNA の塩基置換が個体差である silent polymorphism か病因かの判断には, われわれがとった方法論をとるか, または, 多くの症例に同一の変異が検出され, かつ正常には検出されず, さらに, その部位の塩基は正常では種を越えて保存されていることが必要であろう。塩基置換がある遺伝子に偏っているのは, すでに報告された塩基置換部位の周辺を解析する頻度が高いという人為的なものか, 突然変異—変異遺伝子の優位な増幅—生存個体の形成という過程をへることができる遺伝子変異に何らかの共通性があるのかは興味ある課題である。

Table 1. Disease-related point mutations in mitochondrial DNA and clinical features.

Base number gene	Substituted base	Clinical subtype	Clinical features
3243 tRNA-Leu (UUR)	A to G	MELAS	mental deficiency, epilepsy, ataxia, deafness, short stature, stroke-like episode, etc.
3243 tRNA-Leu (UUR)	A to G	NIDDM	NIDDM, deafness
3260 tRNA-Leu (UUR)	T to G	cardiomyopathy	cardiomyopathy, myopathy
3271 tRNA-Leu (UUR)	T to C	MELAS	
4269 tRNA-Ileu	A to G	arrdiomyopathy	fatal cardiomyopathy
4317 tRNA-Ileu	A to G	cardiomyopathy	
8344 tRNA-Lys	A to G	MERRF	Mental deficiency, myoclonus epilepsy, ataxia, deafness, short stature, muscle weakness
3460 ND 1	G to A	LHON	optic atrophy
4160 ND 1	T to C	LHON	optic atrophy, encephalopathy
11778 ND 1	A to G	LHON	optic atrophy
15257 cytochrome <i>b</i>	G to A	LHON	optic atrophy
8993 ATPase	T to G	NARP	muscle weakness, ataxia, retinitis pigmentosa
8993 ATPase	T to G	Leigh encephalopathy	

MELAS: mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes, NIDDM: Noninsulin-dependent diabetes mellitus, MERRF: myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers, LHON: Leber's hereditary optic neuropathy, NARP: neurogenic muscle weakness, ataxia and retinitis pigmentosa.

mtDNA 変異と年齢と臨床病型

ミトコンドリア異常症の臨床病型で奇妙な特徴の一つは、同じ変異でまったく病像の異なる疾患があることである。tRNA-Leu (UUR) 遺伝子上の 3243 変異は多くの MELAS の遺伝子変異だが、同じく 3243 変異を有する糖尿病の大家系がオランダで見いだされて以来²²⁾、わが国にも少なからぬ症例があると考えられている。その特徴はインスリン非依存性の成人型糖尿病であり、発症は中年、母系遺伝し、糖尿病発症前の年齢では難聴がある症例が多い。他の MELAS にみる症候は示さないものである。すなわち、ある程度以上の変異遺伝子を引き継いで個体が形成された場合と、一定量以下を引き継いで形成された場合とでは障害にいたる組織が異なるようである。3243 の糖尿病の中年以降の発症は、なぜ成人型糖尿病が中年に発症するのかと同質の問題であるように思える。ミトコンドリア異常症では、発症が早いほど死にいたる経過は短く、発症が遅いほど進行も遅い傾向がある。細胞内の変異 mtDNA の割合とそれに起因するミトコンドリア内蛋白合成の低下と ATP 産生能の低下の程度×年数がある一定程度以上になると細胞機能の障害が前面に出、その程度がまた、細胞種により大きく異なることが考えられ、mtDNA 変異と病像の関連は未だ多くの未知の因子の集積である。Table 1 に現時点で疾患と関連あると考えられている塩基置換を示す。

ミトコンドリア異常症の問題点

核遺伝子変異による疾患と異なる点は、①変異遺伝子の量が発症を規定する、②保因者と発症者の区別は血球細胞の変異遺伝子量ではつかない、したがって、③出生前診断で変異遺伝子が検出されても生涯保因者で終わるか、発症するかは現時点では不明である、④変異遺伝子保有者でも必ずしも血球で遺伝子診断できるとは限らない、⑤遺伝子治療にはミトコンドリア内に一定数以上入れ、一定数以上のミトコンドリアに入れるという制約があり、困難である、にまとめられる。mtDNA に起因する疾患はほぼ発見されたのか、あるいは氷山の一角が見えてきたのか、いずれにしても、この数年の進歩は急速であるとはいえ、多くの新たな問題点が明らかになったことは事実である。

文 献

- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ II, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242: 1427-30.
- Anderson S, Bakier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-65.

- 3) Pavlakis SG, Phillips PC, DiM auro S, De Vivo DC, Rowland LP. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes: A distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 1984; 16: 481-8.
- 4) Nakamigawa T, Momoi MY, Momoi T, Yanagisawa M. Generation of human myogenic cell lines by the transformation of primary culture with origin-defective SV 40 DNA. *J Neurol Sci* 1988; 83: 305-19.
- 5) Simoizumi H, Momoi MY, Ohta S, Kagawa Y, Momoi T, Yanagisawa M. Cytochrome *c* oxidase-deficient myogenic cell lines in mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 1989; 25: 615-21.
- 6) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Kagawa Y, Momoi T, Yanagisawa M. A point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 816-22.
- 7) Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Simoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S. Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes (MELAS). *Am J Hum Genet* 1991; 49: 590-9.
- 8) Kobayashi Y, Ichihashi K, Ohta S, Nihei K, Kagawa Y, Yanagisawa M, Momoi MY. The mutant mitochondrial genes in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes (MELAS) were selectively amplified through generations. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 803-8.
- 9) Itoh S, Momoi T, Nakauchi H, Momoi MY. The mutant mitochondrial genes are not stochastically segregated in patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes (MELAS). (in submitted).
- 10) Hukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): Disease entity or syndrome? Light and electron microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci* 1980; 47: 117-33.
- 11) Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonus epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) associated with mitochondrial tRNA-Lys mutation. *Cell* 1990; 61: 931-7.
- 12) Howell N, Kubacka I, Xu M, McCullough A. Leber hereditary optic neuropathy: Involvement of the mitochondrial ND 1 gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 935-42.
- 13) Huoponen K, Vikki J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus M-L. A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1147-53.
- 14) Johns DR, Neufeld MJ. Cytochrome *b* mutation in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 1358-64.
- 15) Holt IJ. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 428-33.
- 16) Harding AE, Holt IJ, Sweeney MG, Brockington SM, Davis MB. Prenatal diagnosis of mitochondrial DNA 8993 mTG disease. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 629-33.
- 17) Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331: 717-9.
- 18) Pearson HA, Lobel JS, Kocoshis SA, Naiman JL, Windmiller J, Lammi AT, Hoffman R. A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J Pediatr* 1979; 95: 976-84.
- 19) Cormier V, Rotig A, Quartino AR, Forni GL, Cerone R, Maier M, Saudubray J-M, Munnich A. Widespread multitissue deletions of mitochondrial genome in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *J Pediatr* 1990; 117: 599-602.
- 20) McShane MA, Hammans SR, Sweeney M, Holt IJ, Beattie TJ, Brett EM, Harding AE. Pearson syndrome and mitochondrial encephalopathy in a patient with a deletion of mtDNA. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 39-42.
- 21) Zeviani M, Gellera C, Antozzi C, Rimoldi M, Morandi L, Villani F, Firanii V, DiDonato S. Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: associated with mutation in mitochondrial DNA tRNA-Leu (UUR). *Lancet* 1991; 338: 143-6.
- 22) van den Ouweland LMW, Lemkes HHPI, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PAA, van den Kamp JJP, Maassen JA. Mutation in mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nature Genet* 1992; 1: 368-71.