

### 2.7. Spectrophotometric assays of respiratory chain enzyme activity

Skeletal muscle mitochondria from biopsy specimens were isolated and the crude mitochondrial pellet was resuspended, as previously described (Bookelman et al., 1978). The isolated mitochondria were immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until biochemical analysis was done. Spectrophotometric determinations of enzyme activity including rotenone-sensitive NADH-cytochrome-*c* reductase (rotenone-sensitive NCCR, complex I + III), succinate-cytochrome-*c* reductase (SCCR, complex II + III) and COX (complex IV) were performed as described elsewhere (Koga et al., 1988). The results of this assay were expressed as nanomoles per minute per milligram of mitochondrial protein.

### 2.8. ATP synthesis

Measurement of ATP synthesis in digitonin-permeabilized primary cultures including myoblasts and fibroblasts was performed with several modifications of the method by Robinson (Robinson, 1996). Briefly, cells were cultured in 6 cm dishes until 100% confluent with DMEM/F-12 medium, 20% fetal bovine serum, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of uridine to support the growth of respiratory deficient cells. Plasma membranes were selectively permeabilized by 0.05 mg/ml of digitonin for 3 min. Cells were then incubated with buffer containing phosphate, adenine-dinucleotide phosphate (ADP) and combinations of substrates and inhibitors including (a) 5 mM sodium pyruvate and 1 mM sodium L-malate, (b) 5 mM sodium glutamate and 1 mM sodium L-malate, (c) 1  $\mu\text{M}$  rotenone and 10 mM sodium succinate, and (d) 2 mM antimycin A, 2 mM sodium ascorbate and 0.5 mM tetramethylphenylenediamine (TMPD). After incubation for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , reactions were stopped and total cell proteins were precipitated by adding 2% trichloroacetate. The aliquots of the incubation buffer were diluted by Tris-acetate (pH 7.75) and assayed for ATP by the luciferin/luciferase chemiluminescence according to the manufacturer's instruction (Enliten ATP assay system and TD-20/20 luminometer, Promega). ATP measurements were determined using standard curves calibrated with fixed amounts of ATP. Precipitated proteins were solubil-

ized by 1% of sodium lauryl sulfate (SDS), and the concentrations were measured using the modified Lowry method (DC protein assay kit II, Bio-Rad). The results of this assay were expressed as nanomoles ATP per hour per milligram cell protein.

### 2.9. Cybrids

Transmitochondrial cybrids were prepared by enucleating primary cultures from patients and fusing mitochondria-containing cytoplasts with the osteosarcoma-derived 143B.TK-rho-zero cells (a cell line devoid of mtDNA) by polyethylene glycol fusion, as previously described (King and Attardi, 1989). Cybrids were selected with DMEM medium supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum and were isolated by the cylinder technique. Many clones with variable percentage of mutant mtDNA were obtained.

## 3. Results

### 3.1. Histopathological study

Histopathological study of skeletal muscle showed no ragged-red fibers, strongly SDH-reactive blood vessels, or COX deficient fibers were detected with mGT, SDH, or COX stains in either patient. Both patients had moderate type 2 fiber atrophy. In patient 2, intermyofibrillar networks were disorganized in some fibers in NADH-TR stained specimens (data not shown). Thus, no pathological signs of mitochondrial abnormalities were found in these biopsies.

### 3.2. Respiratory chain function revealed isolated complex I deficiency

Spectrophotometric assays of skeletal muscle mitochondria from both patients showed significantly decreased activities in rotenone-sensitive NCCR with normal activities in SCCR and COX (Table 1). Furthermore, the ATP synthesis of myoblasts was significantly decreased when pyruvate/malate and glutamate/malate were used as substrates (Fig. 1). ATP synthesis was normal when succinate and TMPD/ascorbate were used as substrates. If the patients had pyruvate dehydrogenase complex

Table 1  
Spectrophotometric assays of respiratory chain enzyme activity

	NCCR	SCCR	COX
Patient 1	2.1	54.0	18.6
Patient 2	3.8	60.8	31.8
Controls ( $n = 5$ )	$27.3 \pm 11.6$	$76.6 \pm 17.7$	$33.0 \pm 16.1$

The results of this assay are expressed as nanomoles per minute per milligram of mitochondrial protein. The control values are presented as mean  $\pm$  1 SD. Abbreviations are as follows: NCCR, rotenone-sensitive NADH-cytochrome-*c* reductase; SCCR, succinate-cytochrome-*c* reductase; COX, cytochrome-*c* oxidase.

abnormalities, a reduction in synthesis would be observed only when pyruvate/malate were used as substrates. Therefore, the findings of two independent assays for respiratory chain confirmed both patients have an isolated complex I deficiency in their muscle. However, the ATP synthesis of fibroblasts in patient 1 was normal. These findings suggest complex I deficiency exists in a tissue-specific manner.

### 3.3. Molecular genetic analysis

Total mtDNA sequence analysis in the patients revealed many polymorphisms (Table 2). No mtDNA rearrangements were detected by the long PCR method. The majorities of the polymorphisms were silent mutations or reported as normal polymorphisms according to a human mitochondrial genome database (MITOMAP) (Kogelnik et al., 1998).

Several homoplasmic mutations in coding regions such as T4216C in ND1, A4317G in tRNA-Ile, G8854A in ATP6, and T11394C in ND4 were not present in 100 normal Japanese adults (Table 2). Among the novel polymorphisms, we focused on a C-to-A mutation at np 11,777, which highly converted an arginine to a serine at codon 340 in the NADH dehydrogenase subunit 4 gene (Fig. 2). Using a PCR-RFLP method, we detected that this mutation was not present in 215 healthy subjects, parents of patient 1, or 98 clinically diagnosed LS patients. The DNA of the mother of patient 2 was not available. This method also revealed the heteroplasmic nature of this mutation in both patients (data not shown). For rapid and accurate quantification of mutant mtDNA, we devised a real-time PCR amplification method using two fluorogenic TaqMan™ probes in the same

tube sharing common reagent. The percentages of mutant type mtDNA in patient 1 were 83% in muscle, 40% in blood, 78% in myoblasts and 57% in fibroblasts. The percentages of mutant type mtDNA in patient 2 were 76% in muscle, 52% in blood, and 76% in myoblasts (Table 3).

### 3.4. Cybrid study

To confirm the 11,777 mutation is pathogenic, we performed functional analysis of transmitochondrial cells (cybrids). Mitochondria from both patients with np 11,777 mutation and a LHON patient with np 11,778 mutation were separately introduced into a human osteosarcoma cell line (143B.TK- cells) lacking mtDNA (143B.TK-/rho-0 cells) and we obtained many clones with a different percentage of heteroplasmic np 11,777 mutation. Only cybrids with homoplasmic np 11,778 mutation were obtained because the patient had a homoplasmic mutation, which is common finding of np 11,778 mutation in LHON patients. ATP synthesis in digitonin permeabilized cells with glutamate and malate was correlated with the percentage of np 11,777 mutation ( $R^2 = 0.789$  in cybrids with mtDNA of patient 1,  $0.769$  in cybrids with mtDNA of patient 2; Pearson's correlation coefficient, Fig. 3a). No significant differences in correlation between the percentage of np 11,777 mutation and ATP synthesis was observed among cybrids with each patients' mtDNA. Moreover, the np 11,778 mutation had a milder effect than the np 11,777 mutation, when comparing cybrids with

Table 3  
Quantification of the np 11,777 mutation using real-time PCR amplification methods

	Sample	Mutation percent value (%)
Patient 1	Muscle	83
	Blood	40
	Myoblasts	78
	Fibroblasts	57
	Father's blood	ND
	Mother's blood	ND
Patient 2	Muscle	76
	Blood	52
	Myoblasts	76

ND, not detected.

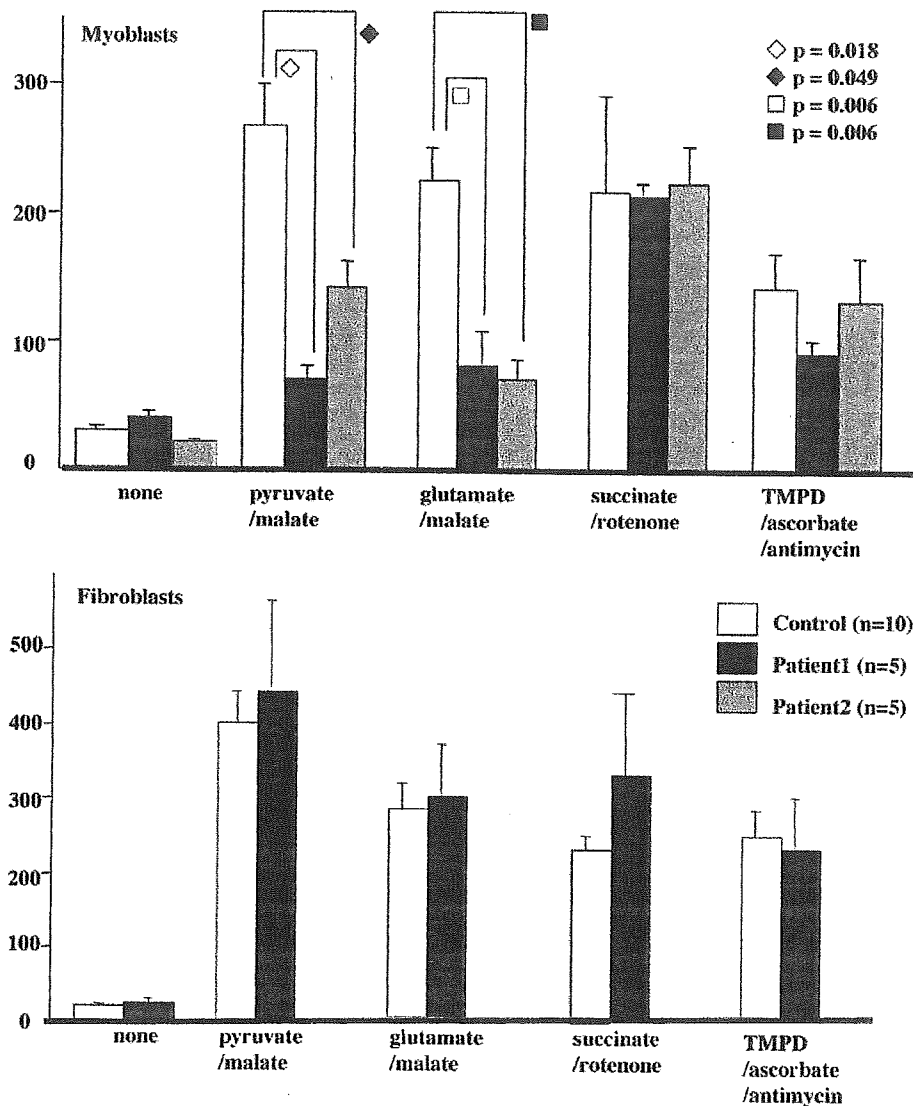


Fig. 1. ATP synthesis in digitonin-treated primary culture of myoblast and fibroblast. ATP synthesis was measured using the following combinations of substrates and specific inhibitors: pyruvate/malate, glutamate/malate, succinate/rotenone, and ascorbate/TMPD/antimycin. The results of this assay are expressed as nanomoles ATP per hour per milligram cell protein. The control values are presented as mean  $\pm$  1 SD.

the homoplasmic np 11,778 mutation to those with more than 90% of np 11,777 mutation (Fig. 3b).

#### 4. Discussion

We identified a novel C-to-A mutation at np 11,777 in the ND4 subunit gene. This mutation is pathogenic for several reasons. First, it was not found in over 200 normal individuals and converted a highly evolutionarily conserved arginine to a serine (i.e. a charged to an

uncharged amino acid). Moreover, the fact that the np 11,778 mutation, the most frequent mutation in LHON patients, also converts the same arginine to a histidine strongly supports the assumption that this mutation is pathogenic (Wallace et al., 1988). Second, the mutation exists in a heteroplasmic condition, which is a common feature of pathogenic mtDNA mutation. Third, respiratory chain function assays in patient 1 indicated an isolated complex I deficiency with tissue specificity, which means that there are abnormalities in muscle and myoblasts, but not in

Table 2  
mtDNA sequence data in two patients

Genes	Patient 1	Patient 2	Comment or frequency
12SrRNA	T1107C	G709A	MITOMAP
	A1438G	A1438G	MITOMAP MITOMAP
16SrRNA	A2706G		MITOMAP
	C3106del	C3106del	MITOMAP
ND1	A4200T	A3426G	MITOMAP
	T4216C (Tyr- > His)		MITOMAP None in 100 Japanese
tRNA- Ile	A4317G		None in 100 Japanese
ND2	A4769G	A4769G	MITOMAP
	A4833G	A4833G	MITOMAP
	G4985A	G4985A	MITOMAP
	C5178A	T5108C	MITOMAP
	A5301G		MITOMAP
T5442C		MITOMAP	
tRNA Trp	C5554T		MITOMAP
COI	C7028T	C7028T	MITOMAP
	A7129G		MITOMAP
COII		T7621C (Ala- > Ala)	Three in 100 Japanese
	C7669T		MITOMAP
ATP6	C8580T		MITOMAP
		A8701G	MITOMAP
	A8860G	G8854A (Ala- > Thr) A8860G	None in 100 Japanese MITOMAP
COIII		T9540C	MITOMAP
ND3	A10397G		MITOMAP
	A10398G	A10398G	MITOMAP
	C10400T	C10400T	MITOMAP
ND4	T10873C	T10873C	MITOMAP
		T11335C	MITOMAP
	T11394C (Leu- > Pro)		None in 100 Japanese
	G11719A	G11719A	MITOMAP
	C11777A	C11777A	None in 100 Japanese
ND5	C12705T	C12705T	MITOMAP
	A12810G		MITOMAP
	C13984T		MITOMAP

*(continued on next page)*

fibroblasts. Tissue specificity is also a common feature of pathogenic mtDNA mutation. Direct enzymatic complex I measurement is hampered by contaminating non-mitochondrial NADH cytochrome-*c* reductase activity in cultured cells (Benit et al., 2001). Therefore, we performed assays of ATP synthesis and rotenone-sensitive NCCR for complex I function. Fourth, the functional analysis of cybrid revealed the significant decrease in respiratory chain function was observed in cells with a higher percentage of mutant mtDNA. Evidence is accumulating that mtDNA mutations can have addictive and even synergistic effects on phenotype (Lertrit et al., 1994; Vergani et al., 1995). Several polymorphisms found in each patient, also present in none of 100 normal controls might have some effects on cell

dysfunction, but cybrid analysis using each patient's mtDNA revealed no significant difference in cell function among cybrids with each patients' mtDNA. Therefore, it seems reasonable to conclude that the np 11,777 mutation is the most dominant in these patients.

A comparison of the polymorphisms especially in the D-loop region between the two patients showed many nucleotide differences, indicating this mutation occurred independently (Table 2). Usually, pathogenic mtDNA point mutations are maternally transmitted including np 11,778 mutation with LHON patients, however, we could not confirm that the np 11,777 mutation was maternally transmitted, because only one mother's blood sample was available and the mutant level in blood could be far too low to detect

Table 2 (continued)

Genes	Patient 1	Patient 2	Comment or frequency
ND6		G14569A	MITOMAP
Cyt b	T14783C	T14766C	MITOMAP
	A14927G		MITOMAP
	G15043A	G15043A	MITOMAP
	G15301A	G15301A	MITOMAP
	A15326G	A15326G	MITOMAP
		A15746G (Ile- > Val)	Four in 100 Japanese
	T15622C		MITOMAP
	G15737A		MITOMAP
D-loop	C16184ins		MITOMAP
	C16190del		MITOMAP
	C16233T	C16223T	MITOMAP
		G16274A	MITOMAP
	C16291T		MITOMAP
	T16311C		MITOMAP
	A16316G		MITOMAP
	T16362C	T16362C	MITOMAP
	A73G	A73G	MITOMAP
		G143A	MITOMAP
	C150T		MITOMAP
	C151T		MITOMAP
		T152C	MITOMAP
		T204C	MITOMAP
	A263G	A263G	MITOMAP
	C303del		MITOMAP
	C310ins		MITOMAP
	T489C	T489C	MITOMAP
	C527G		Three in 100 Japanese

MITOMAP means that any polymorphisms have been listed in the database (Kogelnik et al., 1998).

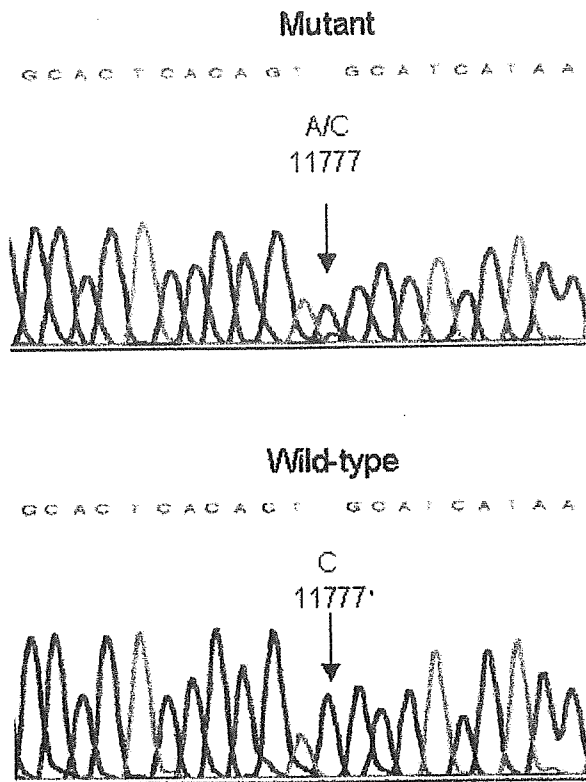


Fig. 2. A heteroplasmic mutation in ND4 gene. Partial nucleotide sequence of ND4 amplified from patient 1 (top) and a control subject (bottom). The mutant sequence exhibits a C-to-A transition at np 11,777, resulting in substitution from arginine to serine at codon 340.

with the PCR technique. In the present study, we screened 100 DNA samples from clinically diagnosed LS patients for this np 11,777 mutation, and discovered it in only these two patients. So far, we have found ten patients with T-to-G mutation at np 8993, three with T-to-C at np 8993, and five with T-to-C at np 9176 (Makino et al., 2000). These findings suggest this np 11,777 mutation is a less common mutation than the mutations in the subunit 6 gene of ATP synthase in Japan.

In the majority of LS patients, the onset is in infancy, and the prognosis is usually poor because of brainstem dysfunction in an early stage of the disease. In the present patients, the relatively high lactate levels compared to pyruvate and neuroradiological findings are compatible with LS. However, the clinical courses are relatively mild, in that, there is no obvious brainstem dysfunction. This symptoma-

tology may be due to the nature of this mutation. As mentioned above, the np 11,777 mutation converts an arginine to a serine at codon 340 in the ND4 gene. Interestingly, this amino acid change also occurs with a np 11,778 mutation, the most common mutation in patients with LHON, but amino acid replacement was different (R340S vs. R340H). There were no signs of optic neuropathy in detailed examinations by ophthalmologists in either patient. Moreover, there are usually no central nervous system effects of np 11,778 mutation, or mild effects including dystonia, which is the prominent symptom in patient 2. Therefore, it is interesting that the phenotype of LHON patients is quite different from that of the present cases despite the same amino acid substitution. Since the mean onset of LHON patients is in their 20s, we suppose the np 11,777 mutation may produce optic neuropathy in later life.

A few functional studies infer that ND4 may be involved in the binding of the ubisemiquinone intermediate that is also formed in the oxidation of NADH by complex I (Fearnley and Walker, 1992; Degli Esposti et al., 1993, 1994; Gray et al., 1994). According to a model made by multiple sequence analysis, an arginine of codon 340 is located at the beginning of the transmembrane helix near the matrix side of the membrane (Fearnley and Walker, 1992; Degli Esposti et al., 1994) and protein-bound ubisemiquinone anions are stabilized by positively charged amino acids such as arginine (Gray et al., 1994). The conversion of arginine to a weakly charged histidine by the np 11,778 mutation, or an uncharged serine by the np 11,777 mutation, may cause instability of the ubisemiquinone bound to complex I, resulting in defective electron transport. Our data using the cybrids cells with both np 11,777 and 11,778 mutation demonstrated the defects in complex I function, and the np 11,777 mutation caused a more severe defect in ATP synthesis than the np 11,778 mutation. The cause of the differences in phenotype between the np 11,777 and 11,778 mutation is unclear, however, the difference in the ubisemiquinone binding property produced by each amino acid substitution may affect the differences in phenotypic severity. Further studies on the difference between the np 11,777 and 11,778 mutations are needed to provide key information for the roles of

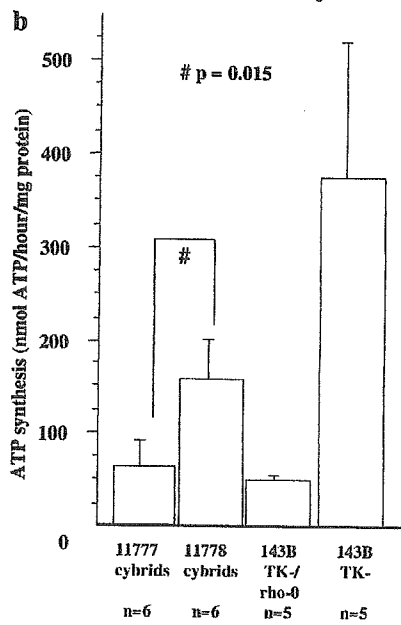
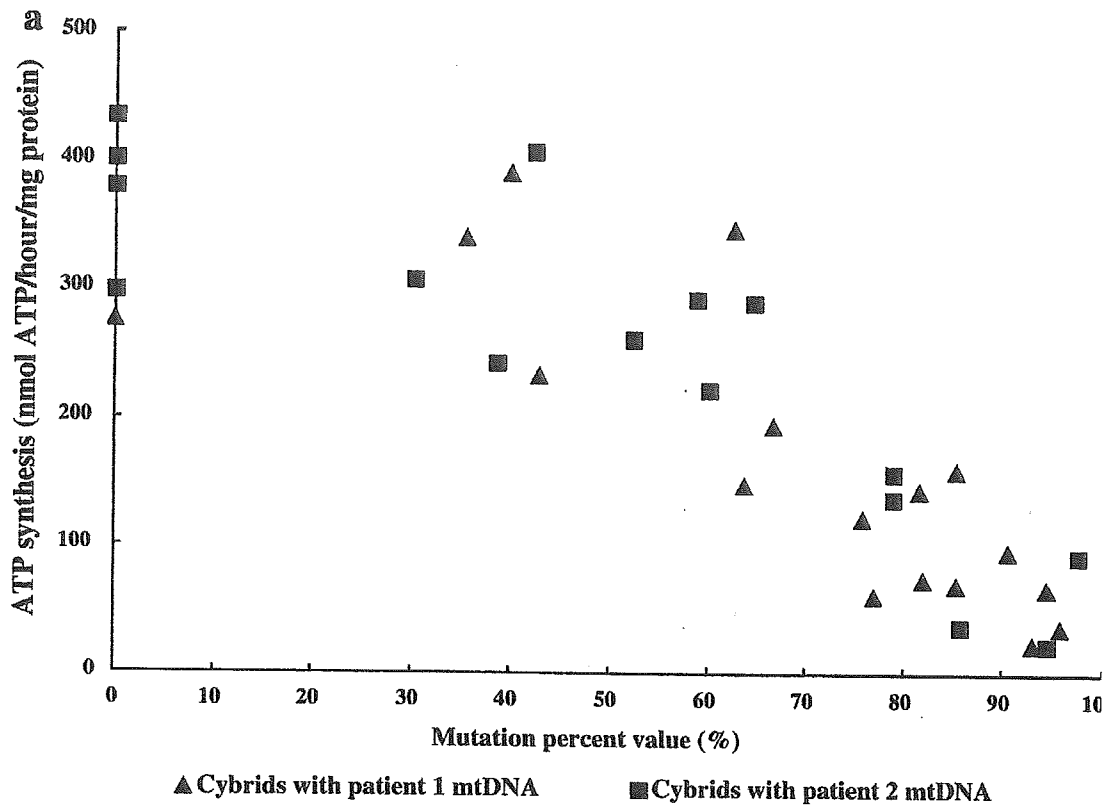


Fig. 3. ATP synthesis in cybrids. (a) Glutamate + malate as substrates in 143B-derived cybrid clones with various percentages of the np 11,777 mutation from each patient were used. (b) The reduction in ATP synthesis of the np 11,777 mutation with over 90% mutant was more marked than that of the homoplasmic np 11778 mutation. The values of 143B original and their derived rho-0 cells stand for normal control and baseline, respectively.

ND4 in complex I biogenesis and the genotype–phenotype relationship.

## Acknowledgements

We thank Dr Kohji Tomita for providing us with the clinical information. This study was supported in part by Health Sciences Research Grants for the Research on Brain Science (Y.G., I.N.) and Research Grants for Psychiatric and Neurological Diseases (Y.G.) from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

## References

- Akanuma, J., Muraki, K., Komaki, H., Nonaka, I., Goto, Y., 2000. Two pathogenic point mutations exist in the authentic mitochondrial genome, not in the nuclear pseudogene. *J. Hum. Genet.* 45, 337–341.
- Benit, P., Chretien, D., Kadhon, N., et al., 2001. Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUF51 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1344–1352.
- Bookelman, H., Trijbels, J.M.F., Sengers, R.C.A., Janssen, A.J.M., 1978. Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria isolated from fresh and frozen stored muscle specimens. *Biochem. Med.* 19, 366–373.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., et al., 1995. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat. Genet.* 11, 144–148.
- Carrozzo, R., Tessa, A., Vazquez-Memije, M.E., et al., 2001. The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome. *Neurology* 56, 687–690.
- Degli Esposti, M.D., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., Meyer, A., 1993. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 243–271.
- Degli Esposti, M., Carelli, V., Ghelli, A., et al., 1994. Functional alterations of the mitochondrially encoded ND4 subunit associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *FEBS Lett.* 352, 375–379.
- de Vries, D.D., van Engelen, B.G., Gabreels, F.J., Ruitenbeek, W., van Oost, B.A., 1993. A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome. *Ann. Neurol.* 34, 410–412.
- DiMauro, S., Bonilla, E., De Vivo, D.C., 1999. Does the patient have a mitochondrial encephalomyopathy? *J. Child Neurol.* 14, S23–S35.
- Endo, H., Hasegawa, K., Narisawa, K., Tada, K., Kagawa, Y., Ohta, S., 1989. Defective gene in lactic acidosis: abnormal pyruvate dehydrogenase E1 alpha-subunit caused by a frame shift. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 358–364.
- Fearnley, I.M., Walker, J.E., 1992. Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1140, 105–134.
- Gray, K.A., Dutton, P.L., Daldal, F., 1994. Requirement of histidine 217 for ubiquinone reductase activity (Qi site) in the cytochrome *bc1* complex. *Biochemistry* 33, 723–733.
- King, M.P., Attardi, G.M., 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246, 500–503.
- Kirby, D.M., Kahler, S.G., Freckmann, M.L., Reddihough, D., Thorburn, D.R., 2000. Leigh disease caused by the mitochondrial DNA G14459A mutation in unrelated families. *Ann. Neurol.* 48, 102–104.
- Koga, Y., Nonaka, I., Sunohara, N., Yamanaka, R., Kumagai, K., 1988. Variability in the activity in of respiratory chain enzymes in mitochondrial myopathy. *Acta Neuropathol. (Berl)* 76, 135–141.
- Kogelnik, A.M., Lott, M.T., Brown, M.D., Navathe, S.B., Wallace, D.C., 1998. MITOMAP: a human mitochondrial genome database – 1998 update. *Nucleic Acids Res.* 26, 112–115.
- Leigh, D., 1951. Subacute necrotizing encephalopathy in an infant. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 14, 216–221.
- Lertrit, P., Kapsa, R.M.I., Jean-Francois, M.J.B., et al., 1994. Mitochondrial DNA polymorphism in disease: a possible contributor to respiratory dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1973–1981.
- Loeffen, J., Smeitink, J., Triepels, R., et al., 1998. The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1598–1608.
- Loeffen, J.L., Smeitink, J.A., Trijbels, J.M., et al., 2000. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum. Mutat.* 15, 123–134.
- Makino, M., Horai, S., Goto, Y., Nonaka, I., 2000. Mitochondrial DNA mutations in Leigh syndrome and their phylogenetic implications. *J. Hum. Genet.* 45, 69–75.
- Miranda, A.F., 1994. Diseased muscle in tissue culture. In: Engel, A.G., Franzini-Armstrong, C. (Eds.), *Myology*, McGraw Hill/USA, New York, NY, pp. 1046–1070.
- Richler, C., Yaffe, D., 1970. The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev. Biol.* 23, 1–22.
- Robinson, B.H., 1996. Use of fibroblast and lymphoblast cultures for detection of respiratory chain defects. In: Attardi, G.M., Chomyn, A. (Eds.), *Methods in Enzymology* No. 264, Academic Press/USA, San Diego, CA, pp. 454–463.
- Shoubridge, E.A., 2001. Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2277–2284.
- Silvestri, G., Ciafaloni, E., Santorelli, F.M., et al., 1993. Clinical features associated with the A→G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ('MERRF mutation'). *Neurology* 43, 1200–1206.
- Sue, C.M., Bruno, C., Andreu, A.L., et al., 1999. Infantile encephalopathy associated with the MELAS A3243G mutation. *J. Pediatr.* 134, 696–700.
- Tatuch, Y., Christodoulou, J., Feigenbaum, A., et al., 1992. Heteroplasmic mtDNA mutation (T-G) at 8993 can cause



- Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 852–858.
- Thyagarajan, D., Shanske, S., Vazquez-Memije, M., De Vivo, D.C., DiMauro, S., 1995. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann. Neurol.* 38, 468–472.
- Triepels, R.H., van den Heuvel, L.P., Loeffen, J.L.C.M., et al., 1999. Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUF7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann. Neurol.* 45, 787–790.
- van den Heuvel, L., Ruitenbeck, W., Smeets, R., et al., 1998. Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18 kD (AQDQ) subunit. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 262–268.
- Vergani, L., Martinuzzi, A., Carelli, V., et al., 1995. MtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 880–888.
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., et al., 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242, 1427–1430.
- Zhu, Z., Yao, J., Johns, T., et al., 1998. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome *c* oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.* 20, 337–343.

# ミトコンドリア脳筋症の病因・病態解析

後藤 雄一

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第2部 部長

ミトコンドリア脳筋症の病因は、大きく核DNAとミトコンドリアDNAに分けられる。ミトコンドリアDNA異常による病態の理解には、ミトコンドリアDNAのコピー数が多いという性質に依存するヘテロプラスミーの表現型を知ることが重要である。そのために、患者由来の培養細胞、モデル動物を用いた研究が行われている。一方、病因となる核DNA変異が次々と明らかになってきた。特にミトコンドリアDNAの複製・維持に関わる因子の遺伝子変異例の発見から、核-ミトコンドリア相互作用に関わる新しい分野が開けてきている。



ミトコンドリア脳筋症, ミトコンドリアDNA, ヘテロプラスミー, 閾値効果, dNTPプール, アンチコドン修飾, タウリン, Mito-mice.

## はじめに

ミトコンドリア脳筋症は、1962年のLuftらによる疾患概念の提唱に始まる。生化学的・形態学的手法に加えて、1988年のHoltらによるミトコンドリアDNA (mtDNA) 欠失の発見から分子遺伝学的手法が加わり、病因・病態に関する研究が大きく進展した。最近、核DNA上に存在するミトコンドリア病に関わる遺伝子変異が次々と同定され、その知見に基づいた詳細な病態・治療研究が進められている。さらに、ミトコンドリアが細胞内エネルギー産生以外に、酸化ストレス・アポトーシス・細胞内カルシウム動態に重要な役

割を持つことが明らかにされ、ミトコンドリア脳筋症ばかりでなく、種々の神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病など）の病態における修飾因子としてのミトコンドリア機能異常が注目されてきている。

本稿では、ミトコンドリア脳筋症に関する最近の進歩を、特に病因と病態解析に焦点を当てて解説する。

## I. 病因に関する新しい知見

### 1. ミトコンドリアDNA異常

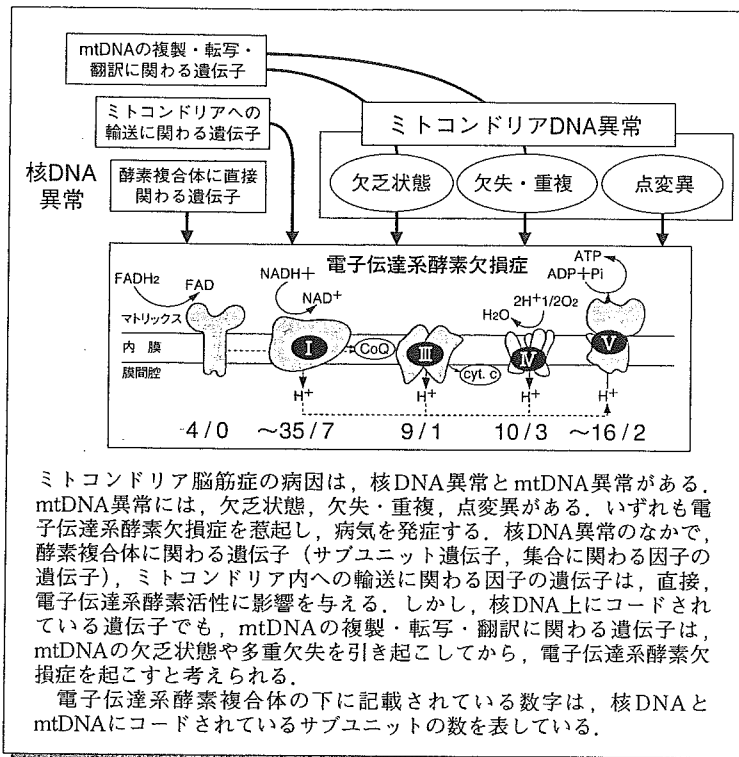
ミトコンドリア脳筋症の病因としてmtDNA異常と核DNA上の遺伝子変異がある (図1)。mtDNAは、

Yu-ichi Goto

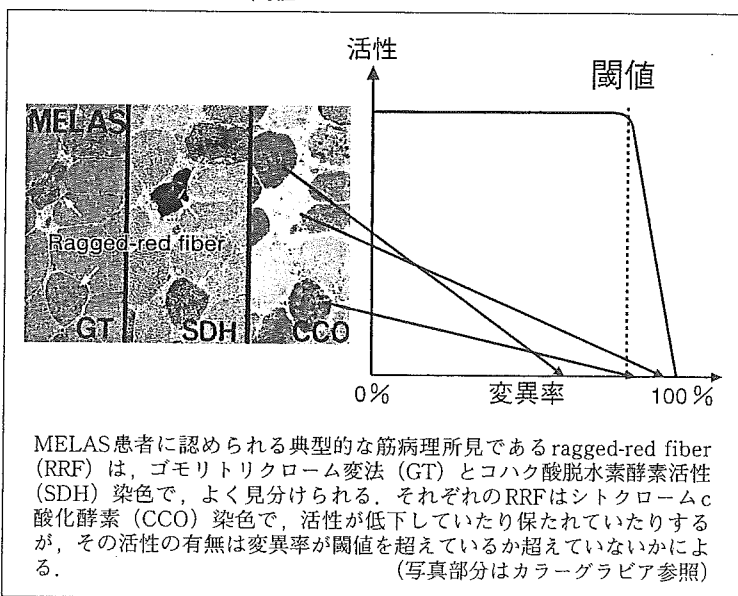
Department of Mental Retardation & Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology & Psychiatry, Director  
E-mail: goto@ncup.go.jp

: Study on genetics and pathogenesis of mitochondrial eucephalomyopathies

図① ミトコンドリア脳筋症の病因



図② ヘテロプラスミーと閾値



1個のミトコンドリア内に5ないし10コピー存在しており、さらにミトコンドリアは1細胞内に数十から数百個存在している。すなわち、mtDNAは1細胞に数百から数千コピー存在していることになる。mtDNA異常には質的異常と量的異常があり、質的異常として、欠失・重複、点変異が、量的異常として欠乏状態（1細胞内のコピー数の減少）が報告されている。最近になっても、新しい病因的 point mutation の報告が相次ぎ、総数として、転移RNAもしくはリボソームRNA領域の点変異が50あまり、タンパク質をコードしている領域の点変異も40あまりとなっている。

mtDNA異常の特徴として、多くの転移RNA上の点変異は、1細胞内に変異型と正常型が混在する状態が存在すること（これをヘテロプラスミーという）がほとんどであり、一方、タンパク質コード領域に存在する点変異は、変異型のみで存在すること（これをホモプラスミーという）が多い。興味深いのは、ヘテロプラスミーの割合（どれくらいの比率で変異型が存在するかということ）が、生化学的・病理学的な障害度と密接に関わっていることである。また、ヘテロプラスミーの比率が低いときは何も起きないが、それがあつた一定の比率を超えると細胞の障害が出現することが知られており、このような効果を閾値効果と呼んでいる（図②）。この現象から、ある病因的変異が患者で検出されたとしても、閾値を超えない比率で存在しているmtDNAは何も障害を与えていない、すなわち、病気ではない可能性がある。変異mtDNAの存在が必ずしも病気であることと同義でないことは十分理解しておく必要がある。しかし、ホモプラスミーの場合はこのような関係は当てはまらない。

2. 核DNA上の遺伝子変異

(1) 電子伝達系酵素を構成するサブユニットの遺伝子

最近の病因研究での進歩は、核DNA上に存在する遺伝子変異の発見が挙げられる（表①）。まず、電子伝達系酵素複合体の核DNA由来のサブユニット遺伝子

変異として、複合体 I の *NDUFV1*, *NDUFS4*, *NDUFS7*, *NDUFS8*, *NDUFS2*, *NDUFS1* の 6 個に発見された<sup>11-6)</sup>。複合体 I の核由来サブユニットは 30 数個知られており、これ以外のサブユニット遺伝子の変異が存在することは否定できない。しかし、すべての複合体 I 欠損症に対して、30 個以上の遺伝子を網羅的に検索することは困難であり、今のところ遺伝子診断は臨床応用することはできていない。これらの多くは、生化学的には複合体 I 欠損を示し、臨床的には Leigh 脳症、心筋症があるのが特徴である。また、ある Leigh 脳症患者では複合体 II のフラボプロテインサ

ブユニットをコードしている *SDHA* 遺伝子の変異が報告された<sup>7-9)</sup>。

(2) 酵素複合体の集合に関わる因子の遺伝子

電子伝達系酵素複合体サブユニットそのものではなく、集合に関わる因子の遺伝子変異も報告されている。その代表は、複合体 IV (チトクローム c 酸化酵素: COX) 欠損を伴う Leigh 脳症で認める *SURF-1* 変異である。この遺伝子産物の機能はまだ明らかにされていないが、欠損すると COX 集合に障害の起こることが示されている<sup>10)</sup>。また、同じ COX 欠損を示す患者で、心筋症を伴う脳筋症患者で *SCO2*<sup>11)</sup>、肝不全を伴う脳筋症患者で *SCO1*<sup>12)</sup>、また別の脳筋症患者で *COX10*<sup>13)</sup> の遺伝子変異が報告された。また複合体 III 欠損患者で、集合因子である *BCS1L* 遺伝子の変異が同定されている<sup>14)</sup>。

(3) ミトコンドリア DNA の維持・複製に関わる因子

ミトコンドリア DNA の維持・複製に関わる核 DNA 由来因子の遺伝子変異も次々と明らかにされている。この場合、mtDNA 側の異常としては、多重欠失と欠乏状態が惹起される。すなわち、核 DNA 変異と mtDNA 異常が一緒に存在していることになる。多重欠失を起こす遺伝子変異は、*TP* (thymidine phosphorylase)<sup>15)</sup>、*ANT-1* (adenine nucleotide translocator-1)<sup>16)</sup>、*Twinkle*<sup>17)</sup>、*POLG* (DNA polymerase gamma)<sup>18)</sup> が知られており、そのうち *TP* は劣性遺伝、それ以外の遺伝子は優性遺伝家系の原因遺伝子となっている。また、mtDNA の欠乏状態は、*TP* 以外に、*TK2* (thymidine kinase 2)<sup>19)</sup>、*dGK* (deoxyguanosine kinase)<sup>20)</sup> が報告された。これらは、ミトコンドリア内の dNTP プールの維持に関与していると考えられ、その破綻が mtDNA 複製に悪影響を与えるものと考えられている。さらに、mtDNA の転写・複製に関わる *Tfam1* のノックアウトマウスで、ヒトのミトコンドリア脳筋症と類似した症状を示すことが報告されたが<sup>21) 22)</sup>、*Tfam1* の遺伝子変異はヒトではいまだ見出されていない。

表 1 核 DNA 変異

病因遺伝子	臨床表現型
複合体 I サブユニット	
<i>NDUFV1</i>	脳筋症
<i>NDUFS4</i>	Leigh 脳症
<i>NDUFS7</i>	Leigh 脳症
<i>NDUFS8</i>	心筋症を伴う Leigh 脳症
<i>NDUFS2</i>	心筋症を伴う脳筋症
<i>NDUFS1</i>	脳筋症, Leigh 脳症
複合体 II サブユニット	
<i>SDHA</i>	Leigh 脳症, 視神経萎縮+運動失調
<i>SDHB</i>	家族性褐色細胞腫, 遺伝性傍神経節腫
<i>SDHC, SDHD</i>	遺伝性傍神経節腫
複合体 III に関係する因子	
<i>BCS1L</i>	GRACILE 症候群 腎尿細管障害+肝障害を伴う筋症
複合体 IV に関係する因子	
<i>SURF-1</i>	Leigh 脳症
<i>SCO2</i>	心筋症を伴う脳筋症
<i>SCO1</i>	肝不全を伴う脳筋症
<i>COX10</i>	脳筋症
<i>COX15</i>	心筋症を伴う脳筋症
その他	
<i>TP</i>	MNGIE (mitochondrial neuro-gastro-intestinal encephalomyopathy)
<i>ANT-1</i>	進行性外眼筋麻痺症候群
<i>Twinkle</i>	進行性外眼筋麻痺症候群
<i>POLG</i>	進行性外眼筋麻痺症候群
<i>TK2</i>	ミトコンドリア DNA 欠乏症候群
<i>dGK</i>	ミトコンドリア DNA 欠乏症候群

図③ タウリン修飾とその異常

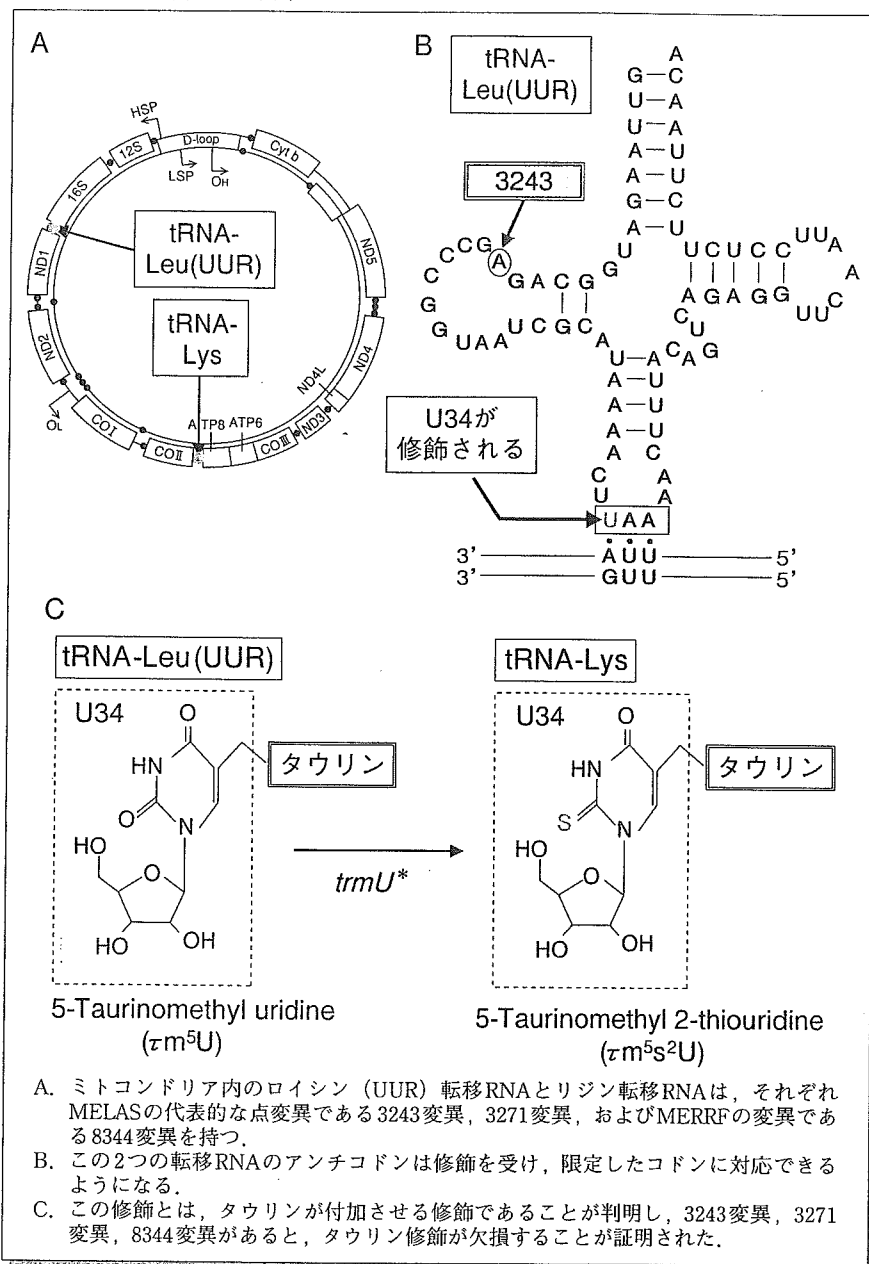
## II. 病態に関する 新しい知見

### 1. 細胞レベルの研究成果

ミトコンドリア脳筋症の病態を理解するには、遺伝子型と表現型との関係を理解することである。その際に、ミトコンドリア、細胞、組織、臓器、個体などの構造上のレベルを認識しておくことが重要である。mtDNA異常が原因で起こるミトコンドリア脳筋症の場合、1細胞に数千コピー存在するmtDNAが、どのような挙動をとり、ミトコンドリア、細胞という構造レベルでその発現効果が表現されるのかは、主に培養細胞を用いた研究で進められている。特に、病因的mtDNA点変異のヘテロプラスミーとその効果に関する研究では、いくつか興味深い結果が報告されている。

#### (1) 異なる点変異を持つmtDNA間の代償作用の有無

1つの培養細胞内には、数百のミトコンドリアが存在しており、それがダイナミックに結合したり分裂したりしている。ミトコンドリア脳筋症患者では、そのmtDNAに病的点変異が存在していることになるが、例えば3243変異を例にとると、変異を持つmtDNAが90%以上にならないと酵素活性に異常が出てこない。すなわち90%の変異率が閾値である。また、mtDNAは突然変異を生じやすいことも知られている。そこで、



老化の原因として、mtDNAの点変異の蓄積が電子伝達系酵素活性の低下を招き、細胞が病的になるという仮説が提唱されている。実際に、変異の蓄積は、細胞レベルでどう表現されるのであろう。

ミトコンドリア脳筋症の代表的な点変異である3243変異と8344変異をそれぞれ持つ培養細胞を融合させ、お互いの酵素活性低下を代償するかどうかという実験がなされ、うまく代償されないことが示された<sup>23) 24)</sup>。しかし、一方で筑波大学の林研究室の実験では、4269

変異と3243変異が互いに代償し合うことを報告した。しかし、代償作用が十分に発揮されるためには、細胞融合後10日から14日もかかることも報告された<sup>25)</sup>。代償がないとするグループも反論を試みており、この代償があるかどうかの結論は、老化に伴うmtDNAの変異蓄積が細胞障害を引き起こすかどうかを決定づける重要な要因であるので、たいへん興味深い。

## (2) アンチコドン修飾異常

MELAS (高乳酸血症, 脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症) の代表的な点変異である3243変異, 3271変異とMERRF (ミオクローヌスてんかんを伴うミトコンドリア脳筋症) の代表的な変異である8344変異は, それぞれロイシン (UUR) 転移RNAとリジン転移RNA内に存在する (図③A)。ロイシン (UUR) 転移RNAはコドンUUAとUUGを認識し, リジン転移RNAはコドンAAAとAAGを認識する。東京大学の安川大学院生, 鈴木講師, 渡辺教授, 日本医科大学の大田教授らは, コドン3文字目がAかGの場合に認識できるこれらの転移RNAにおいて, 正常ではアンチコドンの1文字目 (U34) がタウリン修飾を受けているのに, 患者由来の変異を持つ転移RNAではその修飾が欠損していることを見出した<sup>20)-22)</sup> (図③C)。そして, 実際の転移RNA活性を調べ, 対応するアミノ酸の翻訳効率が落ちること, コドン-アンチコドンの対合自体が弱まることを証明した。これらの実験結果は, 変異を持つ転移RNAそのものが, 翻訳反応レベルで異常をきたしうることを直接的に証明したことになる。

## 2. 組織・臓器レベルの病態に関する新知見

組織・臓器レベルのミトコンドリア脳筋症患者の研究も不可欠である。細胞レベルでの基礎研究が進んでも, その知見が直ちに組織・臓器レベル, すなわち臨床レベルでの情報とはなりにくい。特に, ミトコンドリア脳筋症において, 再生が活発な骨格筋や肝臓細胞と, 再生の乏しい心筋や神経細胞とでは, その病態が

異なることは明らかである。ミトコンドリア脳筋症においてもいくつかの疾患モデルが作製されてきたが, mtDNA変異を有するモデル動物は実在しなかった。しかし, 2000年にわれわれと筑波大学, 国立感染症研究所との共同研究で, ヒトの病気と同様な欠失mtDNAを有するマウス (Mito-Mice) の作出に成功した<sup>29) 30)</sup>。

欠失mtDNAを80%以上で有するMito-Miceは生後約2ヵ月くらいから体重増加不良を認め, おおよそ6ヵ月で死亡する。死因は腎不全で, 病理学的には高度の糸球体硬化像を認める。また, 網膜変性, 心伝導障害, 高乳酸血症を認め, 筋病理所見もヒトの所見と酷似している。従って, Mito-Miceは, ヒトのKearns-Sayre症候群 (KSS) の疾患モデルといえる。KSSでは, 大脳白質の変性所見や糖尿病の合併なども認められるので, その点の確認などが今後の課題である。

Mito-Miceとヒトの病気の間で最も大きな相違点は, 遺伝形式である。KSSは通常遺伝性がなく, 突然変異で起こると考えられている。ただし, ヒトの場合でも欠失と同時に重複が存在するときは, 母系遺伝したと考えられる症例が報告されている。Mito-Miceを調べたところ, 骨格筋を含むいくつかの臓器で, 重複mtDNAの存在が確認されている<sup>29)</sup>。重複mtDNAの存在と母系遺伝との関係について, Mito-Miceの卵細胞を詳細に検討することで, 新しい知見が得られる可能性がある。

## 参考文献

- 1) Benit P, Chretien D, et al: Am J Hum Genet 68, 1344-1352, 2001.
- 2) Loeffen J, Smeitink J, et al: Am J Hum Genet 63, 1598-1608, 1998.
- 3) Loeffen J, Elpeleg O, et al: Ann Neurol 49, 195-201, 2001.
- 4) Schuelke M, Smeitink J, et al: Nat Genet 21, 260-261, 1999.
- 5) Triepels RH, van den Heuvel LP, et al: Ann Neurol 45, 787-789, 1999.
- 6) van den Heuvel LP, Ruitenbeek W, et al: Am J Hum Genet 62, 262-268, 1998.

- 7) Birch-Machin MA, Taylor RW, et al: Ann Neurol 48, 330-335, 2000.
- 8) Bourgeron T, Rustin P, et al: Nat Genet 11, 144-148, 1995.
- 9) Parfait B, Chretien D, et al: Hum Genet 106, 236-243, 2000.
- 10) Tiranti V, Galimberti C, et al: Hum Mol Genet 8, 2533-2540, 1999.
- 11) Papadopoulou LC, Sue CM, et al: Nat Genet 23, 333-337, 1999.
- 12) Valnot I, Osmond S, et al: Am J Hum Genet 67, 1104-1109, 2000.
- 13) Valnot I, von Kleist-Retzow JC, et al: Hum Mol Genet 9, 1245-1249, 2000.
- 14) de Lonlay P, Valnot I, et al: Nat Genet 29, 57-60, 2001.
- 15) Nishino I, Spinazzola A, et al: Science 283, 689-692, 1999.
- 16) Kaukonen J, Juselius JK, et al: Science 289, 782-785, 2000.
- 17) Spelbrink JN, Li FY, et al: Nat Genet 28, 200-201, 2001.
- 18) van Goethem G, Dermaut B, et al: Nat Genet 28, 211-212, 2001.
- 19) Saada A, Shaag A, et al: Nat Genet 29, 342-344, 2001.
- 20) Mandel H, Szargel R, et al: Nat Genet 29, 337-341, 2001.
- 21) Larsson NG, Wang J, et al: Nat Genet 18, 231-236, 1998.
- 22) Wang J, Wilhelmsson H, et al: Nat Genet 21, 133-137, 1999.
- 23) Enriquez JA, Cabezas-Herrera J, et al: J Biol Chem 275, 11207-11215, 2000.
- 24) Yoneda M, Miyatake T, et al: Mol Cell Biol 14, 2699-2712, 1994.
- 25) Ono T, Isobe K, et al: Nat Genet 28, 272-275, 2001.
- 26) Yasukawa T, Suzuki T, et al: J Biol Chem 275, 4251-4257, 2000.
- 27) Yasukawa T, Suzuki T, et al: FEBS Lett 467, 175-178, 2000.
- 28) Suzuki T, Suzuki T, et al: EMBO J 21, 6581-6589, 2002.
- 29) Inoue K, Nakada K, et al: Nat Genet 26, 176-181, 2000.
- 30) Nakada K, Inoue K, et al: Nat Med 7, 934-940, 2001.

### 第2回大阪北部(彩都)地域知的クラスターシンポジウム

#### 「バイオベンチャーと製薬企業とのアライアンス：共存の可能性を探る」

主催：大阪北部(彩都)地域知的クラスター本部  
 後援：文部科学省・近畿経済産業局・大阪府(社)関西経  
 (予定) 済連合会・大阪商工会議所・大阪医薬品協会・NPO  
 法人近畿バイオインダストリー振興会議(財)大阪産  
 業振興機構・彩都(国際文化公園都市)建設推進協  
 議会・国際文化公園都市(株)

開催日：11月4日(火)13:00~17:00

場所：千里ライフサイエンスセンター5階ライフホール

#### プログラム

基調講演：ベンチャーと企業との共存の可能性  
 日経BP社先端技術情報センター長……………宮田 満  
 一般講演：企業の立場から見た期待されるベンチャー  
 山之内製薬創薬研究本部研究推進部主任研究員…根本 靖久  
 :ベンチャーの立場から見た期待される企業  
 (株)メディカル・プロテオスコープ取締役会長……………藤田 芳司  
 ナノキャリア(株)代表取締役社長……………中富 一郎  
 :投資家の立場から見たアライアンスのあり方  
 (株)バイオフロンティアパートナーズ代表取締役社長…大滝 義博  
 パネルディスカッション：宮田 満(司会)・根本靖久・藤田芳司  
 中富一郎・大滝義博

参加費：無料 定員：400名(先着順)

申込方法：氏名、勤務先・学校名、〒住所、電話およびFAX  
 番号を記載の上、郵便、FAX、電子メールにて下  
 記宛お申し込みください。参加証は発行しません  
 ので当日は直接ご来場ください。

申込先：〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2  
 千里ライフサイエンスセンタービル8階  
 (財)千里ライフサイエンス振興財団内  
 大阪北部(彩都)地域知的クラスター本部  
 TEL.06-6873-2006 FAX.06-6873-2306  
 E-mail: cluster-lsf@senri-ic.co.jp  
 http://www.senri-ic.co.jp/slf/

### 第19回 Wakoワークショップ

#### 「自然免疫機構：病原体認識, シグナル伝達, 疾患との関連」

開催日：11月28日(金)10:00~17:00

開催場所：全電通ホール(東京:御茶ノ水)

(東京都千代田区神田駿河台3-6, TEL. 03-3119-2211)

総合企画：三宅 健介(東京大学医学研究所感染遺伝学分野教授)

#### 講演プログラム

- 10:00 開催挨拶 和光純薬  
 10:05 はじめに……………三宅 健介(東大医科研)  
 1. 病原体の認識  
 10:10 自然免疫によるウイルス感染細胞認識機構  
 ……荒瀬 尚(千葉大院医)  
 10:50 エンドキシン認識機構……………三宅 健介(東大医科研)  
 11:30 アポトーシスにおけるDNA分解とその異常  
 ……長田 重一(阪大院医)  
 12:10 昼食  
 2. シグナル伝達, 獲得免疫との連携  
 13:10 Toll-like receptorsを介するシグナル伝達経路  
 ……審良 静男(阪大微研)  
 13:50 樹状細胞機能と免疫応答の制御  
 ……稲葉 カヨ(京大院生命科学)  
 14:30 CD25+CD4+制御性T細胞による免疫制御  
 ……坂口 志文(京大再生研)  
 15:10 コーヒーブレイク  
 3. 疾患との関連  
 15:30 自然免疫とアレルギー……………中西 憲司(兵庫医大)  
 16:10 自然免疫関連分子の遺伝子変異と疾患との関連  
 ……白川 太郎(京大院医)  
 16:50 おわりに……………三宅 健介(東大医科研)  
 17:00 閉会挨拶 和光純薬  
 参加費：無料 定員：420名(先着順)  
 申込先：和光純薬工業株式会社  
 試薬営業本部 学術部 ワークショップ係  
 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号  
 TEL: 03-3270-8582 FAX: 03-3270-8243  
 E-mail: seminar@wako-chem.co.jp

## 核遺伝子変異によるミトコンドリア異常症

後藤 雄一\*

抄録 核 DNA 上にある遺伝子変異によっておこるミトコンドリア異常症のうち、電子伝達系酵素欠損症とミトコンドリア DNA の複製・維持に関わる病態を解説した。ミトコンドリア DNA の異常によっておきる数々の病態との関係から、核 DNA とミトコンドリア DNA の複雑な相互関係が徐々にあきらかにされつつある。ミトコンドリアの持つ機能が、エネルギー代謝に限らず、アポトーシス、活性酸素産生、カルシウムイオンの保持などに及び、病態を多面的に理解する必要性がでてきた。

脳科学 25 : 321-328, 2003

*key words : electron transfer complex, mitochondrial DNA, multiple deletion, mitochondrial DNA depletion*

## I. はじめに

ミトコンドリアの機能は細胞内のエネルギー産生が主体である。したがって、ミトコンドリア病とはそのエネルギー産生が低下することで細胞機能が障害され、臨床症状が現れている疾患である。ミトコンドリア内には、多くのエネルギー代謝に関わる酵素が存在していることから、これらの酵素の活性低下がミトコンドリア病の原因になり得る。しかしながら関連する酵素は多数存在しその欠損症すべてをここで網羅することは不可能である。そこで、ミトコンドリア DNA と核 DNA の両者にコードされているサブユニットから構成されている電子伝達系酵素複合体とミトコンドリア DNA の維持や複製に関連する核遺伝子変異による病態を解説する。さらに、ミトコンドリア内

で発現する核 DNA にコードされた蛋白の異常による疾患の発見が相次いでおり、それらについても簡単に触れることにする。

## II. 電子伝達系酵素複合体に関わる核遺伝子

## 1. 複合体 I

複合体 I は、TCA 回路や  $\beta$  酸化で生成される NADH (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide) から電子を受け取り、その電子をコエンザイム Q (CoQ) に渡すまでの反応を担っており、NADH-CoQ 還元酵素 (NADH-CoQ reductase) とも呼ばれる。この複合体は、電子伝達系酵素複合体の中で最大であり、その構成はきわめて複雑である。牛の心筋を用いた研究では、少なくとも 41 個の異なるタンパクサブユニットからなり、Flavin mononucleotide: FMN, 鉄-イオウ蛋白, CoQ 類似物質などで構成されているが、その全貌を理解できるまでには到っていない。41 個のサブユニットのうち、ミトコンドリア DNA にコードされているのは 7 個であり、それ以外はすべて核 DNA にコードされている。

表 2 に核 DNA にコードされた複合体 I サブユ

Mitochondrial diseases caused by nuclear gene mutation.

\*国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第二部

[〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1]

Yu-ichi Goto: National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo, 187-8502 Japan.



表1 電子伝達系酵素複合体の構成

複合体名	核 DNA 由来 サブユニット	mtDNA 由来 サブユニット
複合体 I (NADH-CoQ oxidoreductase)	34	7
複合体 II (succinate-CoQ oxidoreductase)	4	0
複合体 III (CoQ-cytochrome c oxidoreductase)	10	1
複合体 IV (cytochrome c oxidase)	10	3
複合体 V (ATP synthase)	10~16	2

ニットで、ヒトの病気で変異が確認されたものを掲げた。その臨床症状は、乳児期発症の脳症、脳筋症、Leigh 脳症であり、ほとんどは早期に死亡する重症の経過をとっている<sup>2,11,12,20,23,27)</sup>。複合体 I 欠損症の生化学的診断は容易ではなく、また多数のサブユニットについての遺伝子診断も容易でなく、確定診断がされていない症例が多数存在している可能性が高い。

## 2. 複合体 II

電子伝達系酵素複合体のうちミトコンドリア DNA でコードされているサブユニットを持たない唯一の複合体が、複合体 II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) である。この複合体は、フラボプロテインである Fp サブユニット (*SDHA*)、鉄-イオウ蛋白である Ip サブユニット (*SDHB*)、これらを内膜につなげるアンカーとしてはたらき、ヘムを有している 2 つのサブユニット CybL と CybS (*SDHC* と *SDHD*) で構成されている。

病気との関連では、Fp 遺伝子の変異が視神経萎縮と運動失調を示した患者と Leigh 脳症患者 (2 家系) で報告されている<sup>4,5,17)</sup>。また *SDHC* と *SDHD* の変異がそれぞれ家族性傍神経節腫感受性領域 (*PGL3* と *PGL1*) に対応することが報告され、Ip 遺伝子 (*SDHB*) 変異が家族性褐色細胞種および傍神経節腫の感受性と相関のあることが示されている。

## 3. 複合体 III

複合体 III は、複合体 I あるいは複合体 II から CoQ に伝えられた電子をチトクローム c に受け渡す働きがあり、その際 CoQ を酸化しチトクロ

ーム c を還元するので、CoQ-チトクローム c 酸化還元酵素とも呼ばれる。この酵素複合体は、2 個のチトクローム b、チトクローム c1、鉄-イオウ蛋白、Q 結合蛋白、コア蛋白などを含む 11 個のサブユニットからなる。ミトコンドリア DNA でコードされているのは、チトクローム b のみであり、残りは核 DNA にコードされている。

サブユニット自体の遺伝子変異はミトコンドリア DNA 以外には報告されていないが、複合体 III の集合に関わる因子である BCS1L の遺伝子変異が報告された<sup>29)</sup>。その症状は、成長障害 (growth retardation)、アミノ酸尿 (aminoaciduria)、胆汁うっ滞 (cholestasis)、鉄過剰 (iron overload)、乳酸アシドーシス (lactic acidosis)、早期死亡 (early death) であり、これらの頭文字をとって GRACILE 症候群と称される。また、トルコから報告された BCS1L の変異を持つ症例では、複合体 III 欠損による尿管機能異常、脳症、肝不全の症状を示した<sup>6)</sup>。

## 4. 複合体 IV

複合体 IV は、電子伝達系酵素反応の最終段階を受け持ち、チトクローム c を酸化し、二酸化炭素と水を生成するため、チトクローム c 酸化酵素 (COX) と呼ばれる。13 個のサブユニットからなり、3 個がミトコンドリア DNA で、10 個が核 DNA にコードされている。COX 活性は生化学的にも、また組織化学的にも証明できるので、COX 欠損症はミトコンドリア病のなかではもっとも研究の進んでいる疾患である。

ミトコンドリア DNA がコードしている 3 個のサブユニットは、ミトコンドリア DNA のいろいろな変異 (欠失、転移 RNA 内の点変異、サブユ

表2 ミトコンドリア病の病因となる核DNA遺伝子

病因遺伝子	臨床表現型
複合体Iサブユニット NDUFV1 NDUFS4 NDUFS7 NDUFS8 NDUFS2 NDUFS1	脳筋症 Leigh 脳症 Leigh 脳症 心筋症を伴う Leigh 脳症 心筋症を伴う脳筋症 脳筋症, Leigh 脳症
複合体IIサブユニット SDHA SDHB SDHC, SDHD	Leigh 脳症, 視神経萎縮+運動失調 家族性褐色細胞腫, 遺伝性傍神経節腫 遺伝性傍神経節腫
複合体IIIに関する因子 BCS1L	GRACILE 症候群 腎尿細管障害+肝障害を伴う筋症
複合体IVに関する因子 SURF-1 SCO2 SCO1 COX10 COX15	Leigh 脳症 心筋症を伴う脳筋症 肝不全を伴う脳筋症 脳筋症 心筋症を伴う脳筋症
その他 Thymidine phosphorylase ANT-1 Twinkle Mitochondrial polymerase $\gamma$ Thymidine kinase-2 Deoxyguanosine kinase	MNGIE 進行性外眼筋麻痺症候群 進行性外眼筋麻痺症候群 進行性外眼筋麻痺症候群 ミトコンドリア DNA 欠乏症候群 ミトコンドリア DNA 欠乏症候群

ニット内の点変異で異常を来していると考えられる症例が報告されている。しかし、核DNAでコードされている10個のサブユニットについてはその責任遺伝子に変異が見つかった症例の報告はない。しかし、COXの集合に関わる遺伝子である、SURF1<sup>22,31)</sup>, SCO1<sup>25)</sup>, SCO2<sup>16)</sup>, COX10<sup>26)</sup>, COX15<sup>1)</sup>に遺伝子変異が同定されている。

SURF1変異は、COX欠損を伴うLeigh脳症患者の一部で認められる。患者の骨格筋をCOX染色すると、骨格筋ばかりでなく、血管、筋紡錘などの細胞もCOX活性を持たない。この所見は皮膚生検でも確認できる。すでに多くのミス変異、ナンセンス変異、スプライス変異が報告されており、遺伝子診断にはすべてのエクソンとイントロン-エクソン境界の検査が必要になる。時に、一

つのアレルにしか変異が同定されないことがあり、その意味付けは分かっていない。

SCO2とCOX15の変異は、重篤な心筋症を伴う乳児型のCOX欠損症症例で見いだされた。またSCO1変異は、ケトアシドーシス、肝不全を伴う乳児期発症の症例で、COX10変異は脳筋症患者で報告された。これらは、いずれもまだ日本人での報告例はない。

### Ⅲ. ミトコンドリアDNAの複製・維持に関わる核遺伝子

#### 1. adenine nucleotide translocator (ANT) 1

ANTはミトコンドリア内膜に局在し、マトリクス内のATPと細胞外のADPを交換輸送する

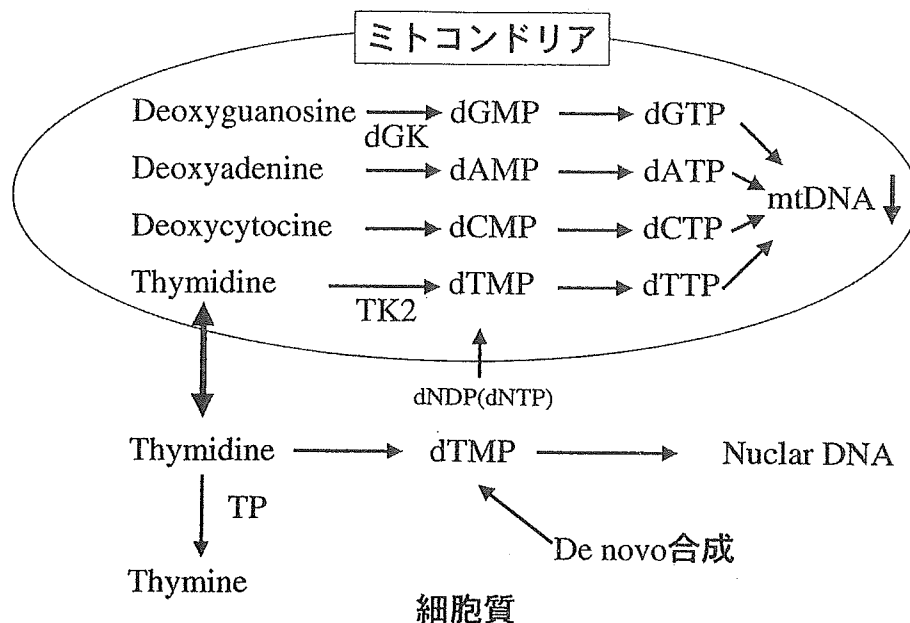


図1 ミトコンドリア内 dNTP プールの調節とその破綻

細胞内のチミジンは TP によって分解されチミンになるか、リン酸化されて DNA 合成に利用される。TP 活性のない MNGIE 患者ではチミンに分解されない結果として細胞内のチミジン量が高く、骨格筋のような非分裂細胞ではミトコンドリア内の TK2 のみ発現しているため、ミトコンドリア内に入ってリン酸化される経路が活性化され、dNTP プールの量的アンバランスが起きると考えられる。一方、dGK と TK2 の機能低下は、それぞれ dGTP、dTTP の低下を来し、TP 活性低下の場合と同様に dNTP プールのアンバランスを起こすと予想される。

機能を持つ。この交換では、ATPの方がより負の電荷を持つために、電荷の移動も起き、膜電位の保持にも関わっている。さらに、ANTはPermeability transition poreの構成要素の一つとしてアポトーシスにも関与している。ヒトでは3つのアイソフォームがあり、骨格筋と心筋に主に発現しているものがANT1である。

常染色体優性遺伝形式の進行性外眼筋麻痺症候群の家系の連鎖解析から4q33-35の領域に責任領域がマップされたあと、その中に存在するANT1遺伝子の塩基配列を調べたところ、変異が見いだされたのが最初である<sup>9)</sup>。日本の症例でも、ANT1変異が同定されている<sup>10)</sup>。ANT1変異があると、ミトコンドリアDNAの多重欠失が認められるが、その詳細な機序は不明である。

## 2. DNA polymerase $\gamma$ (POLG), Twinkle

POLGはミトコンドリアに存在するDNAポリメラーゼであり、ANT1同様に、連鎖解析により

15q22-26にマップできたミトコンドリアDNAの多重欠失を持つ大家系を用いて、POLG遺伝子内にヘテロ接合体を見いだされた<sup>28)</sup>。さらに別の劣性遺伝の家系から、複合ヘテロ接合体が見いだされた。優性遺伝か劣性遺伝かは、変異の種類とその障害程度によるものであろうと推測されている。

Twinkleは、10q24に連鎖する家系における病因遺伝子の検索から同定されたC10orf2という新規遺伝子が、バクテリオファージのT7プライマーゼ・ヘリカーゼgene 4 protein (gp4)と相同性が高いところから名付けられたものである(Twinkle:T7 gp4-like protein with intramitochondrial nucleoid localization)<sup>21)</sup>。Twinkleは、アミノ末端にミトコンドリア局在シグナルを有し、ヌクレオイド(ミトコンドリアDNA-蛋白複合体)に一致した分布を示した。さらに培養細胞にTwinkle遺伝子を導入し強発現を行ったところ、ミトコンドリア分画でのヘリカーゼ活性の

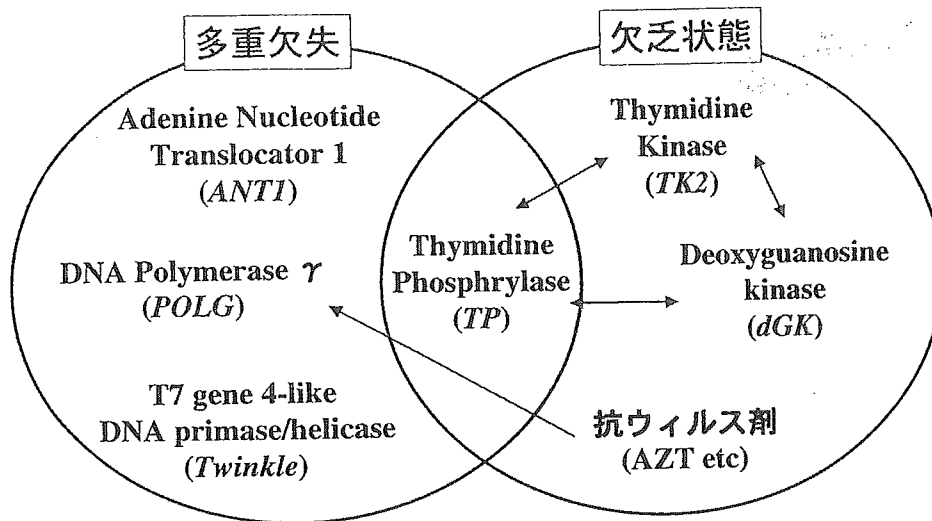


図2 多重欠失と欠乏状態に関連する遺伝子

ミトコンドリア DNA の複製や維持に関わる遺伝子の変異は、ミトコンドリア DNA の多重欠失と欠乏状態を引き起こす。TP, TK2, dGK はいずれもミトコンドリア内の dNTP プールのアンバランスを引き起こし、主に欠乏状態を引き起こすが、ANT1, POLG, Twinkle は多重欠失を起こす。しかしながら、AIDS の治療薬である AZT などの抗ウイルス剤は、ミトコンドリア DNA の欠乏状態を引き起こすが、AZT は POLG の活性を低下させることが知られている。多重欠失と欠乏状態の関係は密接である。

上昇を認めた。ヘリカーゼは、二本鎖のポリヌクレオチドを一本鎖にする酵素のことで、DNA 複製や転写活性に重要な働きをしている。最近の研究で、従来信じられてきた二つの複製点から時間差で複製されるという strand-asynchronous replication ではなく、実は D ループから同時に両方向の複製が行われる strand-coupled replication が優位であるが判明した(一口メモ参照)<sup>7,30</sup>。このような複製機構と Twinkle の機能との関係、ミトコンドリア DNA の多重欠失の起きるメカニズムの解明は、今後の研究課題である。

### 3. dNTP プールに関わる遺伝子

常染色体劣性遺伝形式をとり、消化管運動障害、末梢神経障害、白質脳症、ミオパチーを呈する成人で発症するミトコンドリア病である MNGIE (mitochondrial neuro-gastro-intestinal encephalomyopathy) において、患者骨格筋ではミトコンドリア DNA の多重欠失や欠乏を認める。この疾患の責任遺伝子が thymidine phosphorylase (TP1) であることが証明された<sup>15)</sup>。

実はこの遺伝子産物はミトコンドリア内にはな

く、なぜミトコンドリア DNA の異常が引き起こされるか明らかではない。しかし、TP 活性がなくなると細胞質内でのチミンの合成がなくなり、過剰なチミジンはサルベージ回路である DNA 合成系に用いられる。その際、非分裂細胞である骨格筋などはミトコンドリア内の TK2 活性のみが存在するため、ミトコンドリア内の dTTP が増加し、dNTP プールのアンバランスが生じ、結果としてミトコンドリア DNA の合成が低下するものと考えられている。このモデルは、同様にミトコンドリア DNA の欠乏状態を引き起こす TK2 や dGK の遺伝子異常が確認されたことから、その妥当性が高まっている<sup>13,18)</sup>。ただし、dNTP プールのアンバランスが実際に確認されていない(図1)。

また、これら dNTP プールに影響すると考えられている遺伝子変異と、多重欠失を引き起こす遺伝子変異の関係を図2に示す。おそらく共通の、もしくは類似した機序で、多重欠失と欠乏が生じていると推察される。