

Moreover, mitochondria in the MIDAS-expressing transfectants were stained more strongly than those in the control cells. Another transfectant clone CMV-MIDAS9 showed the same results (data not shown).

The mitochondria in a siRNA *MIDAS* transfectant, Si-MIDAS11, were dispersed similarly to those in the control transfectant (Si-CTL1) but were less intensely stained (Fig. 5B, third and fourth panels). Another siRNA *MIDAS* transfectant, clone Si-MIDAS5, showed the same results (data not shown).

Electron microscopy showed that mitochondria in the *MIDAS* transfectant were somewhat larger with no marked change in morphology and were neither pathologically swollen nor had lost the cristae structure (Fig. 5C, second panel). In addition, the *MIDAS* transfectants increased the number of mitochondria, whereas the siRNA-transfectants decreased the number of mitochondria (Fig. 5C, fourth panel). These photographs suggest that the number of mitochondria around the nucleus was increased by MIDAS.

Increase in total mitochondrial mass by MIDAS

To quantify the accumulation of mitochondria suggested above, cells were stained with two mitochondria-specific dyes, MitoTracker Red and MitoTracker Green and subjected to flow cytometric analysis (Fig. 6A-C). There was no significant difference in forward scatter among any of the cells examined (FS in Fig. 6C), indicating that MIDAS does not have any influence on cell size, regardless of the up- or downregulation of its expression. MitoTracker Green, but not MitoTracker Red, binds to mitochondria in a membrane-potential-independent manner and fluoresces only in the lipid environment of mitochondria. Fluorescent intensity in green (MitoTracker Green) was measured to estimate overall mitochondrial mass, whereas fluorescent intensity in red (MitoTracker Red) was measured to assess the content of energized mitochondria. The intensities in green and red significantly increased in MIDAS-expressing transfectants (CMV-MIDAS) (Fig. 6A,C). On the other hand, the green and red intensities decreased in the MIDAS downregulated transfectants (Si-MIDAS) (Fig. 6B,C). Quantitative analysis showed that the fluorescent intensities increased 1.5- to 2-fold in the MIDAS-expressing transfectants and decreased to 60-70% in the downregulated transfectants, compared to the control cells, respectively (Fig. 6C). The ratio of the intensity in red to the intensity in green was the same in all the cells examined, indicating that MIDAS does not exert any influence on the membrane potential. To confirm the increase in mitochondria, we stained transfectants with an additional fluorescent dye, TMRM (tetra-methyl-rhodamine methyl ester) specific to mitochondria and obtained a consistent result (supplementary material Fig. S4).

The increase in the fluorescence of MitoTracker Green strongly suggests a substantial increase in total mitochondrial mass caused by MIDAS. Therefore, we estimated total mitochondrial volume by three-dimensional reconstitution of

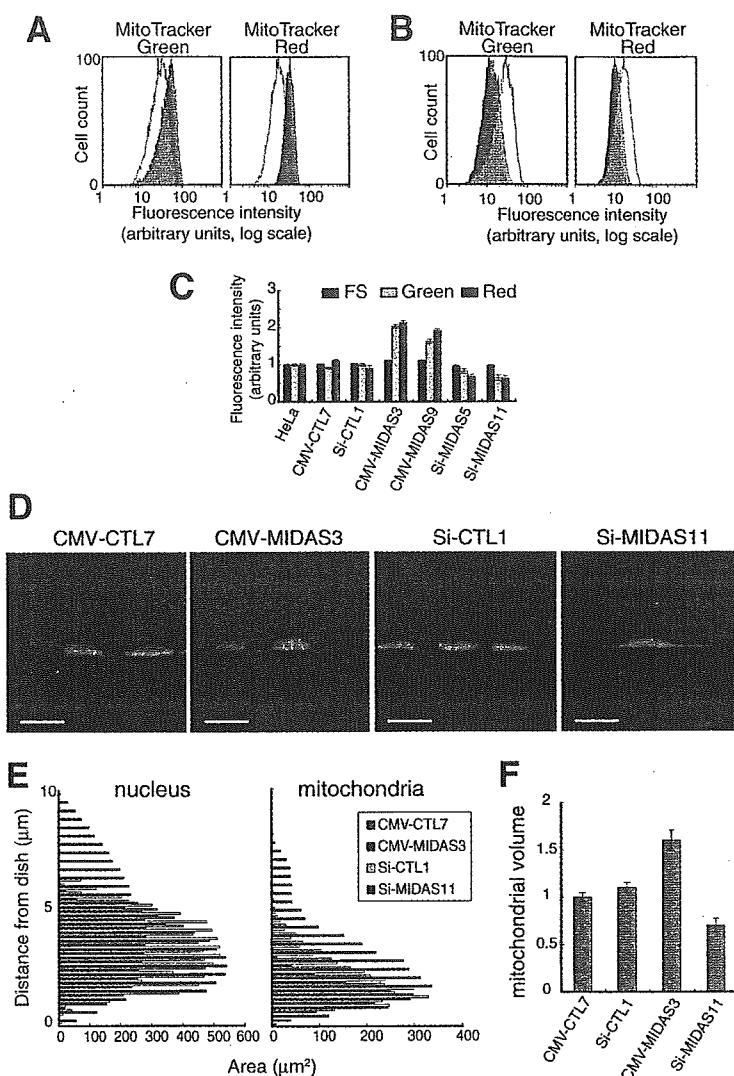


Fig. 6. Changes in mitochondrial mass with MIDAS. (A) Flow cytometric profiles of the fluorescence of dyes specific to mitochondria in CMV-CTL7 (white) and CMV-MIDAS3 (gray). Living transfectants were stained with MitoTracker Green (left) or MitoTracker Red (right) and analyzed with a flow cytometer. (B) Flow cytometric analysis performed with Si-CTL1 (white) and Si-MIDAS11 (gray) cells as described in A. (C) Fluorescence intensity (MitoTracker Green and MitoTracker Red) as well as forward scatter (FS) of HeLa cells and transfectants as quantified by flow cytometry. Values are the mean \pm s.d. (D) The mitochondria and nucleus in control transfectants (CMV-CTL7 and Si-CTL1), *MIDAS* transfectants (CMV-MIDAS3) and siRNA *MIDAS* transfectants (Si-MIDAS11) were stained with MitoTracker Red and SYTO 16 (green), respectively and scanned by confocal laser microscopy in each 0.4 μ m section. Then the side view of a three-dimensional image was reconstructed with Fluoview software. (E) Areas of the nucleus and mitochondria were measured for each section. (F) The total mass of mitochondria in the transfectants was calculated based on the values in E and normalized to that of nucleus. Data represent the mean \pm s.d. of three sets of experiments. Bars, 20 μ m.

cells. Cells were stained with MitoTracker Red (red) for mitochondria and SYTO 16 (green) for the nucleus, respectively. The cells were scanned from bottom to top at intervals of 0.4 μ m and each image was analyzed to measure the areas stained with MitoTracker Red and SYTO 16,

encoded proteins, COX I and COX II and nucleus-encoded mitochondrial proteins, the 30 kDa and 70 kDa subunits of SDH.

Discussion

In this study, we found three nuclear genes that respond to the depletion of mtDNA. Although mtDNA was completely depleted after a long exposure of HeLa cells to ethidium bromide, its nuclear genes may be affected at a high frequency. Thus, we used a cybrid clone, Ft2-11, that had been obtained by the intercellular transfer of wild-type mitochondria into EB8 cells as a control instead of parental HeLa cells. This procedure, cell fusion between enucleated cells (mitochondrion donor) and EB8 cells, would cause no damage to the nuclear genes.

On comparing the mRNA isolated from EB8 cells with that of control cells by differential display, we found three genes whose expression was higher in EB8 cells. Two of them were the apurinic/aprimidinic endonuclease I (APE1/HAP1) (Dempfle et al., 1991) and DNA ligase III genes (Wei et al., 1995). These gene products are located in mitochondria as well as the nucleus and are involved in DNA repair. Thus, it is reasonable to assume that the mitochondrial repair system responds to the depletion of mtDNA.

The third gene product, named MIDAS here, was identical to a Golgi protein, GPP34. The nucleotide sequence of *MIDAS/GPP34* is conserved from yeast to human (Bell et al., 2001; Wu et al., 2000). Its yeast *Saccharomyces cerevisiae* homolog (YDR372c) has been deleted revealing that the gene is not essential for viability (Winzeler et al., 1999; Bidlingmaier and Snyder, 2002). Although a mutation in the YDR372c gene revealed a phenotype with an abnormal budding (Bidlingmaier and Snyder, 2002) and aberrant in protein-vacuolar targeting (Bonangelino et al., 2002), the molecular function of the gene product remains unknown. Genetic analysis showed that there are genetic interactions between YDR372c and intracellular protein-transport factors (RIC1 and YPT6) (Tong et al., 2004). As MIDAS has a leucine-zipper motif (supplementary material Fig. S1), it may interact with a protein involved in intracellular protein transport through this motif.

In most mitochondrial diseases, mutant mtDNA coexists with wild-type mtDNA at various ratios in a heteroplasmic manner and exhibits a cognate pathological phenotype in a threshold-dependent manner. COX-deficient cells have abundant mutant mtDNA, whereas COX-positive cells have a small amount of mutant mtDNA. MIDAS was shown to be more abundant in muscle cells with no COX activity in patients with mitochondrial diseases. This finding indicates that the enhanced expression of MIDAS occurs not only in HeLa cells lacking mtDNA, but also in muscle cells with pathogenic mutant mtDNAs, regardless of point mutations or deletions of mtDNA. MIDAS has putative ATF-1 binding sites and the upregulated expression by EWS/ATF-1 chimeric transcription factor was revealed (Jishage et al., 2003). When mitochondrial dysfunction occurs, the expression of MIDAS may be activated by CREB/ATF-1 family transcription factors.

A previous report (Bell et al., 2001) indicated that GPP34 colocalizes only with Golgi, but not mitochondria. When we used the method they described (Bell et al., 2001) with

permeabilization pretreatment after fixation, anti-MIDAS antibody stained only the Golgi apparatus (Fig. 3D,E). On the other hand, immunostaining clearly showed that MIDAS colocalized with both mitochondria and the Golgi apparatus when the cells were subjected to the acetate/ethanol pretreatment to permeabilize the mitochondrial membranes. An outer membrane protein (Tom 20) did not require the permeabilization procedure for staining, but the acetate/ethanol procedure was essential for the proteins located inside mitochondria such as cytochrome c, Hsp60 and SDH70 (Fig. 3C and supplementary material Fig. S3). Thus, the discrepancy is fully explained by the difference in the permeabilization method used (Fig. 3). The present result is consistent with the result of a sub-organellar fractionation experiment that showed that MIDAS is present in the intermembrane space. Thus, it is concluded that the antibody against MIDAS/GPP34 cannot access the mitochondrial MIDAS without the permeabilization pretreatment. As MIDAS lacks typical sequences that could target mitochondria or the Golgi apparatus, it is unknown how it is directed to the respective organelle.

As MIDAS/GPP34 has an isoform, named GPP34R, one may target mitochondria and the other may target the Golgi apparatus. However, this is unlikely because GPP34R was expressed at a level less than 2% of that of MIDAS in HeLa cells. This small amount cannot account for the relative amount of the protein located in the Golgi apparatus. In addition, we performed a crucial experiment. As the fusion protein comprising Myc-tag and the N-terminus of MIDAS targets only Golgi, the N-terminal region may be responsible for targeting mitochondria. In contrast, an alternative fusion protein with Myc-tag at the C-terminus of MIDAS targets mitochondria. This experiment suggests that the single molecule has the potential to localize to two distinct organelles. Further experiments will reveal which location of MIDAS contributes to its distribution.

Mitochondria gathered around the nucleus in MIDAS-expressing transfectants. As mitochondria often gather around the nucleus in sick cells regardless of internal or external conditions, it may be that toxicity of MIDAS forces mitochondria to concentrate around the nucleus by affecting the cytoskeletal structure. However, no abnormal cytoskeletal structure was found in MIDAS-expressing transfectants (supplementary material Fig. S6). Thus, the mitochondrial accumulation was not due to abnormality of the cytoskeleton. The mitochondrial biogenesis occurs near the nucleus and fresh mitochondria are transported to peripheral areas (Yaffe, 1999). Thus, newly synthesized mitochondria seem to be concentrated around the nucleus and then the excess mitochondria may push up the nucleus as seen in Fig. 5B and Fig. 6D, second panel.

A transcriptional coactivator PGC-1 enhances the expression of many mitochondrial proteins by activating several transcription factors, such as NRF-1, NRF-2, Sp1, YY1, CREB and MEF-2/E-box (Scarpulla, 2002). Recognition sites for NRF-1, NRF-2 and Sp1 are common to most nuclear genes encoding components involved in mitochondrial respiration, transcription and replication (Scarpulla, 2002). However, it is unknown how PGC-1 contributes to the increase in mitochondrial lipids. In addition, there has been no report that PGC-1 is expressed in response to mitochondrial dysfunction or damage. MIDAS seems to accumulate mitochondria by an

alternative pathway from PGC-1 because MIDAS did not enhance mitochondrial transcription (Fig. 7C).

As mitochondria dynamically repeat fusion and fission, it is difficult to clarify their number (Griparic and van der Bliek, 2001; Westermann, 2002). In this study, we thus paid attention to the total mass of mitochondria. Three-dimensional imaging revealed a change in the total mass of mitochondria. The increase was 1.6-fold, which agrees with the increase in strength of the fluorescence of MitoTracker Red and MitoTracker Green in MIDAS-expressing transfectants. This increase is not so small because mitochondria occupy more than 20% of the total volume of the cytoplasm in HeLa cells. When the downregulation and upregulation of MIDAS were compared, the total mass was found to vary more than 2.3-fold from 15% to 35% of the total cytoplasm of HeLa cells. Thus, MIDAS dramatically regulates the total mitochondrial mass.

Mitochondria are often swollen pathogenically or by an increase of cytosolic Ca^{2+} . It may be that the mitochondria are simply swollen owing to the expression of MIDAS. However, this is unlikely for the following reasons. First, the ratio of the intensity in red to the intensity in green was the same in all the cells examined, indicating that MIDAS does not exert any influence on membrane potential (Fig. 6C). Although MIDAS-expressing cells have lower concentrations of mitochondrial protein per volume than controls (Fig. 7C), the levels seem high enough for membrane potential. Second, the downregulation of MIDAS conversely decreased the total mass of mitochondria. Third, mitochondria appear intact morphologically, being independent of the up- or downregulation of MIDAS (Fig. 5C). Finally, it is crucial that the amount of cardiolipin varied depending upon the amount of MIDAS and that the extent of the change was well correlated with the total mass of mitochondria that was revealed by three-dimensional imaging. Cardiolipin is a mitochondrion-specific lipid but accounts for only 20% of mitochondrial lipids. This suggests that not only the amount of cardiolipin but also the total amount of mitochondrial lipids is changed by MIDAS. Taken together, it is concluded that total mitochondrial mass is regulated by MIDAS through the biogenesis of mitochondrial lipids.

The molecular mechanism by which the MIDAS protein increases production of cardiolipin is unknown. A detailed analysis of the MIDAS gene and the function of MIDAS should provide insight into the molecular mechanism by which mitochondrial dysfunction is sensed to increase mitochondria. The fact that MIDAS is colocalized with both mitochondria and the Golgi apparatus may be a key to answering the question of how lipids contribute to mitochondrial accumulation.

We thank K. Mihara of Kyushu University for the gift of anti-Tom20 and anti-Tom40 antibodies, I. Ohsawa and T. Kanamori for helpful advice and K. Yamagata for technical assistance.

References

- Amuthan, G., Biswas, G., Zhang, S. Y., Klein-Szanto, A., Vijayasarathy, C. and Avadhani, N. G. (2001). Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J.* **20**, 1910-1920.
- Asoh, S., Mori, T., Hayashi, J. and Ohta, S. (1996). Expression of the apoptosis-mediator Fas is enhanced by dysfunctional mitochondria. *J. Biochem. (Tokyo)* **120**, 600-607.
- Attardi, G. and Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 289-333.
- Bell, A. W., Ward, M. A., Blackstock, W. P., Freeman, H. N., Choudhary, J. S., Lewis, A. P., Chotai, D., Fazel, A., Gushue, J. N., Paiement, J. et al. (2001). Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 5152-5165.
- Bereiter-Hahn, J. and Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* **27**, 198-219.
- Bidlingmaier, S. and Snyder, M. (2002). Large-scale identification of genes important for apical growth in *Saccharomyces cerevisiae* by directed allele replacement technology (DART) screening. *Funct. Integr. Genomics* **1**, 345-356.
- Biswas, G., Adebajo, O. A., Freedman, B. D., Anandatheerthavarada, H. K., Vijayasarathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M. and Avadhani, N. G. (1999). Retrograde Ca^{2+} signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organellar crosstalk. *EMBO J.* **18**, 522-533.
- Bonangelino, C. J., Chavez, E. M. and Bonifacino, J. S. (2002). Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2486-2501.
- Brunk, C. F. (1981). Mitochondrial proliferation during myogenesis. *Exp. Cell Res.* **136**, 305-309.
- Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* **21**, 1616-1627.
- Cortopassi, G. A. and Wong, A. (1999). Mitochondria in organismal aging and degeneration. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**, 183-193.
- Demple, B., Herman, T. and Chen, D. S. (1991). Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11450-11454.
- Dubowitz, V. (1985). Histological and histochemical stains and reactions. In *Muscle Biopsy: a practical approach*, 2nd edn, (ed. V. Dubowitz), pp. 19-40. London: Balliere Tindall.
- Engel, W. K. and Cunningham, G. G. (1963). Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* **13**, 919-926.
- Erlich, R., Gleeson, P. A., Campbell, P., Dietzsch, E. and Toh, B. H. (1996). Molecular characterization of *trans*-Golgi p230. A human peripheral membrane protein encoded by a gene on chromosome 6p12-22 contains extensive coiled-coil alpha-helical domains and a granin motif. *J. Biol. Chem.* **271**, 8328-8337.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Garesse, R. and Vallejo, C. G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**, 1-16.
- Goglia, F., Moreno, M. and Lanni, A. (1999). Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett.* **452**, 115-120.
- Goto, Y., Nonaka, I. and Horai, S. (1990). A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **348**, 651-653.
- Green, D. R. and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**, 626-629.
- Griparic, L. and van der Bliek, A. M. (2001). The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic* **2**, 235-244.
- Hansson, A., Hance, N., Dufour, E., Rantanen, A., Hultenby, K., Clayton, D. A., Wibom, R. and Larsson, N. G. (2004). A switch in metabolism precedes increased mitochondrial biogenesis in respiratory chain-deficient mouse hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3136-3141.
- Hasegawa, H., Matsuoka, T., Goto, Y. and Nonaka, I. (1991). Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. *Ann. Neurol.* **29**, 601-605.
- Hayashi, J., Ohta, S., Kikuchi, A., Takemitsu, M., Goto, Y. and Nonaka, I. (1991). Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10614-10618.
- Hayashi, J., Ohta, S., Kagawa, Y., Kondo, H., Kaneda, H., Yonekawa, H., Takai, D. and Miyabayashi, S. (1994). Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. Functional integrity of mitochondrial DNA from aged subjects. *J. Biol. Chem.* **269**, 6878-6883.

- Holt, I. J., Harding, A. E. and Morgan-Hughes, J. A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* **331**, 717-719.
- Jishage, M., Fujino, T., Yamazaki, Y., Kuroda, H. and Nakamura, T. (2003). Identification of target genes for EWS/ATF-1 chimeric transcription factor. *Oncogene* **22**, 41-49.
- Kanamori, T., Nishimaki, K., Asoh, S., Ishibashi, Y., Takata, I., Kuwabara, T., Taira, K., Yamaguchi, H., Sugihara, S., Yamazaki, T. et al. (2003). Truncated product of the bifunctional *DLST* gene involved in biogenesis of the respiratory chain. *EMBO J.* **22**, 2913-2923.
- Kang, D. and Hamasaki, N. (2002). Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation. *Curr. Genet.* **41**, 311-322.
- Kawahara, H., Houdou, S. and Inoue, T. (1991). Scanning electron microscopic observations on muscle cells of experimental mitochondrial myopathy produced by 2, 4-dinitrophenol. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **23**, 397-403.
- Klaus, S., Casteilla, L., Bouillaud, F. and Ricquier, D. (1991). The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int. J. Biochem.* **23**, 791-801.
- Kobayashi, Y., Momoi, M. Y., Tominaga, K., Momoi, T., Nihei, K., Yanagisawa, M., Kagawa, Y. and Ohta, S. (1990). A point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 816-822.
- Kobayashi, Y., Momoi, M. Y., Tominaga, K., Shimoizumi, H., Nihei, K., Yanagisawa, M., Kagawa, Y. and Ohta, S. (1991). Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 590-599.
- Kowaltowski, A. J. and Vercesi, A. E. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 463-471.
- Kroemer, G. and Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* **6**, 513-519.
- Liang, P. and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.
- Lightowlers, R. N., Chinnery, P. F., Turnbull, D. M. and Howell, N. (1997). Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet.* **13**, 450-455.
- Melov, S. (2000). Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann. New York Acad. Sci.* **908**, 219-225.
- Moraes, C. T., Ricci, E., Bonilla, E., DiMauro, S. and Schon, E. A. (1992). The mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS): genetic, biochemical and morphological correlations in skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.* **50**, 934-949.
- Moyes, C. D., Mathieu-Costello, O. A., Tsuchiya, N., Filburn, C. and Hansford, R. G. (1997). Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am. J. Physiol.* **272**, C1345-C1351.
- Muller-Hocker, J., Pongratz, D. and Hubner, G. (1986). Activation of mitochondrial ATPase as evidence of loosely coupled oxidative phosphorylation in various skeletal muscle disorders. A histochemical fine-structural study. *J. Neurol. Sci.* **74**, 199-213.
- Munro, S. and Pelham, H. R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**, 899-907.
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S. et al. (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* **299**, 896-899.
- Nisoli, E., Falcone, S., Tonello, C., Cozzi, V., Palomba, L., Fiorani, M., Pisconti, A., Brunelli, S., Cardile, A., Francolini, M. et al. (2004). Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16507-16512.
- Ohta, S. (2003). A multi-functional organelle mitochondrion is involved in cell death, proliferation and disease. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2485-2494.
- Pfanner, N. and Geissler, A. (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 339-349.
- Scarpulla, R. C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**, 1-14.
- Schon, E. A. (2000). Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 555-560.
- Shoubridge, E. A., Karpati, G. and Hastings, K. E. (1990). Deletion mutants are functionally dominant over wild-type mitochondrial genomes in skeletal muscle fiber segments in mitochondrial disease. *Cell* **62**, 43-49.
- Tong, A. H., Lesage, G., Bader, G. D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G. E., Brost, R. L., Chang, M. et al. (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**, 808-813.
- Trounce, I. A., Kim, Y. L., Jun, A. S. and Wallace, D. E. (1996). Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts and transmitochondrial cell lines. *Methods Enzymol.* **264**, 484-509.
- Vorobjev, I. A. and Zorov, D. B. (1983). Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum. *FEBS Lett.* **163**, 311-314.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-1488.
- Weber, K., Ridderskamp, D., Alfert, M., Hoyer, S. and Wiesner, R. J. (2002). Cultivation in glucose-deprived medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in HepG2 hepatoma cells. *Biol. Chem.* **383**, 283-290.
- Wei, Y. F., Robins, P., Carter, K., Caldecott, K., Pappin, D. J., Yu, G. L., Wang, R. P., Shell, B. K., Nash, R. A., Schar, P. et al. (1995). Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3206-3216.
- Westermann, B. (2002). Merging mitochondria matters: Cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep.* **3**, 527-531.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H. et al. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906.
- Wu, C. C., Taylor, R. S., Lane, D. R., Ladinsky, M. S., Weisz, J. A. and Howell, K. E. (2000). GMX33: a novel family of trans-Golgi proteins identified by proteomics. *Traffic* **1**, 963-975.
- Yaffe, M. P. (1999). The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* **283**, 1493-1497.
- Zeller, R. (1998). Preparation of cells and tissues for fluorescence microscopy. In *Cells: A Laboratory Manual. Volume 3 Subcellular localization of genes and their products.* (ed. D. L. Spector, R. D. Goldman and L. A. Leinwand), pp. 98.01-98.20. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Vascular Involvement in a Patient with Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-Like Episodes

NOBUYUKI TAKAHASHI, MD, PHD; TOSHIO SHIMADA, MD, PHD;
YO MURAKAMI, MD, PHD; HARUMI KATOH, MD, PHD; NOBUYUKI OYAKE, MD;
YUTAKA ISHIBASHI, MD, PHD; ICHIZO NISHINO, MD, PHD; IKUYA NONAKA, MD, PHD;
YU-ICHI GOTO, MD, PHD

ABSTRACT: A 26-year-old man with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) was admitted to our hospital for further cardiovascular examination. A muscle biopsy demonstrated strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels. Pulse wave contour analysis revealed that both capacitive and oscillatory compliance were markedly reduced in this patient compared with 45 normal age-matched control subjects. Hepatocyte growth factor

was remarkably elevated in this patient over that of 10 normal control subjects. These findings suggest that a MELAS patient has not only pathologic but also functional vascular involvement. If so, patients with MELAS need systemic vascular assessment. **KEY INDEXING TERMS:** MELAS; Vascular involvement; Pulse wave contour analysis; Hepatocyte growth factor. [*Am J Med Sci* 2005;329(5):265–266.]

Mitochondria are intracellular organelles that produce adenosine triphosphate and contain a small number of genes transmitted only from the mother. Most of these genes are closely related to the energy-producing process. A mitochondrial gene abnormality may therefore lead to fatal organ failure, particularly in mitochondria-rich organs such as the brain and the heart, and in the smooth muscles.

MELAS, or mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes, was first described by Pavlakis et al¹ as a new distinct clinical entity among the mitochondrial encephalomyopathies.

In patients with MELAS, preferential vascular involvement is believed to be responsible for the strikingly episodic nature of its clinical manifestations, as demonstrated in previous studies of mitochondrial abnormalities in arteries of the brain.² Additionally, Sakuta and Nonaka³ found abnormal

mitochondria in the smooth muscle cells of the small arteries in muscle biopsy specimens from MELAS patients. Vascular involvement is not confined to the central nervous system; it may also be present in a number of organs in patients with MELAS.

To our knowledge, however, there have been no reports of functional abnormalities arising from vascular involvement in patients with MELAS. We believe this is the first case study of both pathologic and functional vascular abnormalities in a patient with MELAS.

Case Report

A 26-year-old man with MELAS was admitted to our university hospital for further cardiovascular examination. At the age of 18, the patient had a generalized convulsion and was diagnosed with insulin-dependent diabetes mellitus. At the age of 24, a mitochondrial DNA mutation (A3243G) known to be specific for MELAS⁴ was identified in his leukocytes, and he was diagnosed with MELAS. His mother, sister, and grandmother had suffered from insulin-dependent diabetes mellitus, and the A3243G leukocyte mutation was also identified in his mother. At the age of 26, the patient was admitted to another hospital because of drowsiness, convulsion, right hemiplegia, and aphasia. Two months later, he was referred to our hospital for further cardiovascular examination.

Physical examination showed him to be of short stature (152.2 cm tall) and weighing 34.9 kg. He was normotensive and had no arteriosclerosis obliterans. He displayed severe neurosensory hearing disturbance and mental retardation. A chest radiograph revealed neither cardiomegaly nor pulmonary congestion, and both the electrocardiogram and the echocardiogram showed no abnormal findings.

Muscle biopsy specimens obtained from the left quadriceps

From the Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, Shimane University Faculty of Medicine, Shimane, Japan (NT, TS, YM, HK, NO, YI); and from the Department of Neuromuscular Research (INI, INO) and the Department of Mental Retardation and Birth Defect Research (YG), National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan.

Submitted September 10, 2004; accepted December 6, 2004.

Correspondence: Toshio Shimada, MD, PhD, Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine, Shimane University Faculty of Medicine, 89-1 Enya-cho, Izumo City, Shimane 693-8501, Japan (E-mail address: tshimada@med.shimane-u.ac.jp).

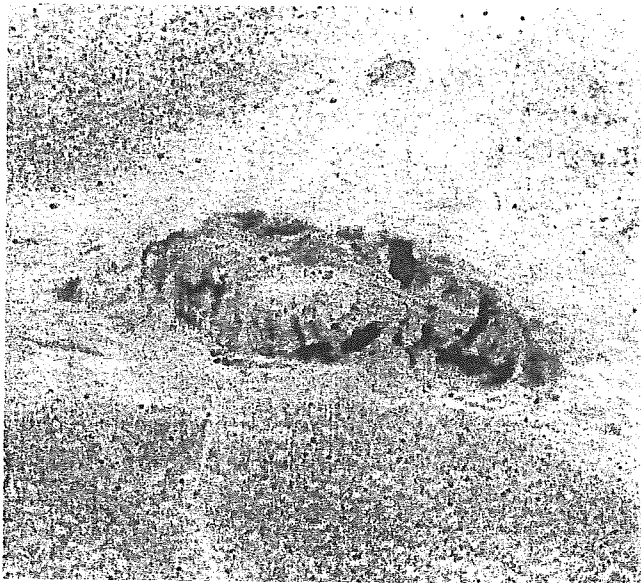


Figure 1. Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in the muscle biopsy obtained from the left quadriceps femoris.

femoris demonstrated strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels, which can be useful for supporting or making a diagnosis of MELAS⁵ (Figure 1). The mutation rate for mitochondria in the patient's skeletal muscle was 78% according to the Taq-Man method. Pulse wave contour analysis, which can be useful for screening vascular disease,⁶ revealed markedly lower compliance, both capacitive and oscillatory, in this patient than in 45 normal control subjects his age (capacitive compliance, 7.7 versus 15.6 ± 3.3 mL/mm Hg $\times 10$; oscillatory compliance, 3.7 versus 8.2 ± 2.7 mL/mm Hg $\times 100$). Hepatocyte growth factor (HGF), which has recently been considered as a possible index of the severity of vascular involvement in patients with hypertension,^{7,8} was found to be remarkably elevated in this patient, compared with 10 normal control subjects (0.29 versus 0.05 ± 0.03 ng/mL).

Discussion

Vascular involvement in patients with MELAS has already been investigated in several studies,^{2,3,5} and it is believed that vascular abnormalities may be responsible for the occasional occurrence of transient cerebral ischemia that causes stroke-like episodes and progressive mental deterioration in patients with MELAS. Vascular involvement in mitochondrial myopathy also extends to the whole body.⁵ To the best of our knowledge, however, there have been no reports on vascular dysfunction in patients with MELAS.

Cohn et al⁶ recently developed noninvasive pulse wave analysis for estimating human vascular properties. We applied this technique to estimate vascular dysfunction in this patient and found both capacitive and oscillatory arterial compliance to be significantly reduced in this patient compared with 45 normal control subjects.

Additionally, HGF is a pleiotropic polypeptide growth factor with abundant biologic activities in a

variety of epithelial tissues.⁹ Endothelial dysfunction in hypertensive patients is well known,¹⁰ and serum HGF has been considered as a possible index of endothelial dysfunction in patients with hypertension.^{7,8} This patient's serum HGF was remarkably elevated compared with that of 10 normal control subjects his age. HGF may also be an indicator of endothelial dysfunction in patients with MELAS.

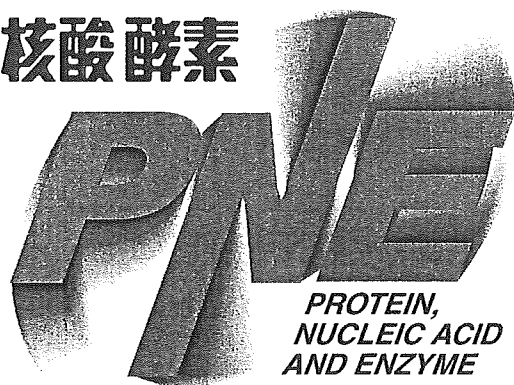
A previous study demonstrated that oscillatory compliance is reduced in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.¹¹ Morishita et al¹² demonstrated, however, that HGF production significantly decreases in accordance with the severity of diabetes mellitus. The elevated serum HGF level and reduced capacitive and oscillatory compliance of this patient may therefore reflect the mitochondrial abnormalities of MELAS rather than diabetes mellitus itself.

These results suggest that patients with MELAS have abnormal vascular dysfunction. Systemic vascular assessment may therefore be needed in future treatment of patients with MELAS.

References

1. Pavlakis SG, Phillips PC, Dimauro S, et al. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 1984;16:481-8.
2. Ohama E, Ohama S, Ikuta F, et al. Mitochondrial angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalopathy. *Acta Neuropathol* 1987;74:226-33.
3. Sakuta R, Nonaka I. Vascular involvement in mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 1989;25:594-601.
4. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNALeu(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990;348:651-3.
5. Hasegawa H, Matsuoka T, Goto Y, et al. Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Ann Neurol* 1991;29:601-5.
6. Cohn J, Finkelstein S, McVeigh G, et al. Noninvasive pulse wave analysis for the early detection of vascular disease. *Hypertension* 1995;26:503-8.
7. Nakamura S, Moriguchi A, Morishita R, et al. A novel vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), as a potential index of the severity of hypertension. *Biochem Biophys Res Com* 1998;242:238-43.
8. Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, et al. Contribution of a vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), to the pathogenesis of cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb* 1998;4:128-34.
9. Boros P, Miller C. Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine. *Lancet* 1995;345:293-5.
10. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, et al. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;323:22-7.
11. McVeigh G, Brennan G, Hayes R, et al. Vascular abnormalities in non-insulin-dependent diabetes mellitus identified by arterial waveform analysis. *Am J Med* 1993;95:424-30.
12. Morishita R, Nakamura S, Nakamura Y, et al. Potential role of an endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes. *Diabetes* 1997;46:138-42.

蛋白質核酸酵素



別刷

「蛋白質 核酸 酵素」編集部

共立出版株式会社

〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19

Tel.03-3947-2515 FAX 03-3944-8182

E-mail : pne@kyoritsu-pub.co.jp

<http://www.kyoritsu-pub.co.jp/>

3. 哺乳類ミトコンドリアゲノムの変異と疾患

ミトコンドリア DNA 異常によるヒト疾患

後藤雄一

ミトコンドリア DNA (mtDNA) 異常により種々の症状が出現することが知られている。とくにエネルギーを多量に必要とする組織・臓器である中枢神経、骨格筋、心臓などに症状が出やすい。mtDNA の異常には、量的異常と質的異常がある。量的異常とは mtDNA 欠乏症候群であり、乳児に発症するものや薬剤性のものが知られている。質的異常には、欠失/重複と点変異があり、種々の臨床病型の原因になっている。mtDNA の欠乏や多重欠失の場合は、mtDNA の複製や維持にかかわる核 DNA 上の遺伝子変異が 1 次的病因である。

▶▶ KEY WORDS : ミトコンドリア病 mtDNA 欠乏症候群 ヘテロプラスミー

■はじめに■

ミトコンドリアの機能異常によって起こるヒトの病気を「ミトコンドリア病」と称している。ミトコンドリアは成熟赤血球以外の全身のあらゆる細胞に存在しており、よってその機能異常は種々の症状を引き起こす。とくに、エネルギーを大量に消費する細胞、組織ではその障害が現れやすく、中枢神経、骨格筋、心筋などにおける症状が前景にでることが多いため、以前はミトコンドリア脳筋症ともよばれていた。ミトコンドリアの機能障害が、細胞レベル、組織レベル、臓器レベルで現れる表現型は異なり、臨床症状としてとらえられるのは組織・臓器レベルの表現型である。たとえば、脳卒中、てんかん、精神症状、夜盲、運動失調、心筋症、易疲労感、糖尿病など、まさにあらゆる症状と関係があるといっていよい。一方で、脳卒中や糖尿病という症状はミトコンドリア機能異常以外の原因でも起こりうるので、それがミトコンドリア病であるというためには、患者におけるミトコンドリア機能異常を証明しなくてはならない。その意味で、細胞レベルのミトコンドリア異常を病理学的、生化学的、分子遺伝学的に明らかにすることが診断の根拠となる。ミトコンドリア病においては、mtDNA 異常や核 DNA 上の遺伝子変異の検索は病因を知るための重要な検査であるが、それだけでは診断を誤る可能性があり、病理学的、生化学的検査を合わせて総合的に診断することが肝要である (図 1)。

I. mtDNA の特徴がそのまま病気の特徴に反映する

mtDNA は環状二本鎖の DNA で、ヒトでは 16,568 塩基からなっている。コードされている蛋白質はすべて電子伝達系酵素のサブユニットであり、ほかに 2 個のリボソーム RNA 遺伝子、22 個の転移 RNA 遺伝子がコードされている。核 DNA と特徴的に異なることは、mtDNA は 1 細胞に数百から数千個存在していることである。それは、1 個のミトコンドリアに 5~10 個の mtDNA が存在し、1 細胞に数十から数百のミトコンドリアが存在しているからである。1 細胞に 1 対 (2 本) の DNA セットしかもたない核 DNA とは著しく異なる。

実際のミトコンドリア病患者でみつかるとは異なる変異 mtDNA は、多くの場合正常 mtDNA と共存している (ヘテロプラスミーという)。すなわち、細胞や組織ごとで、変異 mtDNA と正常 mtDNA の比率が異なるのである。ただし、変異 mtDNA ばかり (ホモプラスミーという) のこともあり、後述する Leigh 脳症に認められる 8993 変異や Leber 視神経萎縮症に認められる 11778 変異の場合などである。

興味深いことに、変異 mtDNA が存在すれば、ミトコンドリア機能異常を必ず引き起こすわけではない。細胞のなかの変異 mtDNA の比率が閾値以上にならないと機能障害が起こらない。これを閾値効果といい、したがって検査で変異 mtDNA が検出されたからといって、病気と断定してはいけなない。

Yu-ichi Goto, 国立精神・神経センター神経研究所 E-mail: goto@ncnp.go.jp www.ncnp.go.jp/nin/guide/r2/index.html
Pathogenic mutations in human mtDNA and their phenotypes

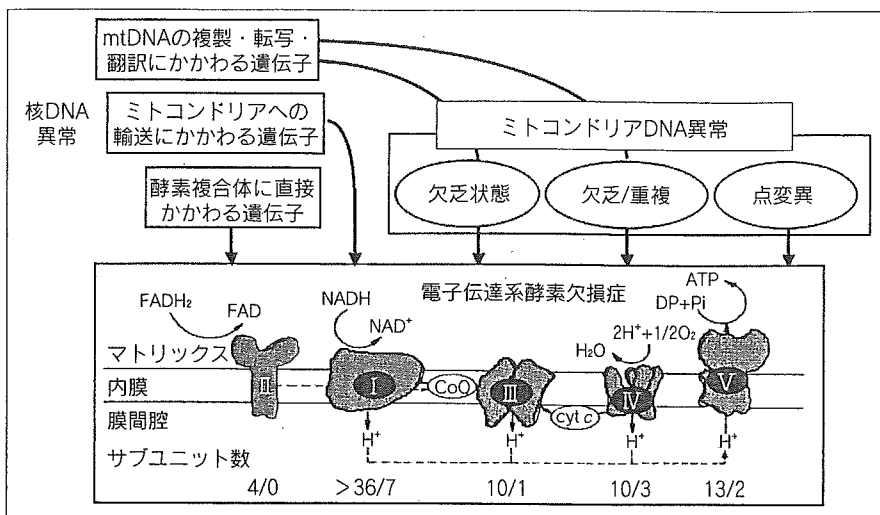


図1 ミトコンドリア病の病因

ミトコンドリア病の病因には、核DNA異常とmtDNA異常がある。mtDNA異常には、欠乏状態、欠失/重複、点変異がある。いずれも電子伝達系酵素欠損症を惹起し、病気を発症する。核DNA異常のなかで、酵素複合体にかかわる遺伝子(サブユニット遺伝子、集合にかかわる因子の遺伝子)、ミトコンドリア内への輸送にかかわる因子の遺伝子は、直接、電子伝達系酵素活性に影響を与える。しかし、核DNA上にコードされている遺伝子でも、mtDNAの複製・転写・翻訳にかかわる遺伝子は、mtDNAの欠乏状態や多重欠失をひき起こしてから、電子伝達系酵素欠損症を起こすと考えられる。

電子伝達系酵素複合体の下に記載されている数字は、核DNA/mtDNAにコードされているサブユニットの数を表している。

ヘテロプラスミーの性質は、細胞や組織ごとの多様性をひき起こす。変異mtDNAは患者のある組織では検出できるのに、別の組織では検出できない可能性があり、実際mtDNAの欠失は、骨格筋では検出できるのに血液細胞や線維芽細胞では検出できないことがある。また、点変異の場合でも、組織ごとに変異mtDNAの比率が大きく異なることがある。したがって、mtDNA検査の対象は罹患臓器にするのが原則である。

しかし、中枢神経を生検することは実際的でなく、通常は骨格筋を対象とする。その理由は、剖検例などの検討で、欠失でも点変異でも変異mtDNAの比率がもっとも高いのが骨格筋であり、骨格筋は同時に病理学的にも生化学的にも検査が可能であるので、総合的に結果を判断できるからである。

II. おもなmtDNA異常と表現型

1. mtDNAの量的異常(欠乏状態)

1細胞中に数千コピー存在しているmtDNAの量が減少することで病的状態が起こる。mtDNAの欠乏状態を

検出するには、核DNA上に存在しているリボソームRNAをコードしている領域(ゲノム上に繰返し配列が数百コピーあるといわれている)を内部標準として、それに対してどの程度の量で存在しているかをサザン法や定量的PCR法で計測する。

この欠乏状態は、遺伝性と薬剤性の場合が知られている。遺伝性としては、最初に記載された腎不全や肝不全を伴う筋症以外に¹⁾、消化器症状と白質変性の特徴とするMNGIE(mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy)、乳児期発症のミオパチータイプなどが知られている(表1)。MNGIEではチミジンホスホリラーゼ1(TP1)²⁾、乳児期発症のミオパチータイプではチミジンキナーゼ2(TK2)³⁾、

デオキシグアノシンキナーゼ(dGK)⁴⁾の遺伝子変異によって起こることが判明している。一方、薬剤性としては、AIDSの治療薬の一つであるAZTによるものももっとも有名である⁵⁾。AZTやddC(ジデオキシシトシン)などの抗ウイルス薬は、ミトコンドリア内のDNAポリメラーゼ活性を阻害するためと考えられている。

2. mtDNAの質的異常: 単一欠失/重複, 多重欠失

16,600近くある塩基が多数欠失した1種類の環状mtDNAが、正常大のmtDNAと混在して存在するのが単一欠失である⁶⁾。また、欠失したmtDNAと正常大のmtDNAがつながったような大きなmtDNAが検出される場合もある⁷⁾。これが重複(実際は部分重複)である。欠失と重複の検出には、サザン法とPCR法が用いられる。

単一欠失/重複を有するミトコンドリア病の代表は、慢性進行性外眼筋麻痺症候群(chronic progressive external ophthalmoplegia:CPEO)、Kearns-Sayre症候群(KSS)であるが、それ以外に乳児期に鉄芽球貧血を含む汎血球減少症、腺外分泌不全を伴うPearson症候群、白質脳症などや老化組織でも検出される(表1)。

欠失の種類が2つ以上ある場合を多重欠失とよんでいる。多重欠失を生じるのは、遺伝性と2次性があり、遺伝性としては常染色体優性遺伝形式の *adenine nucleotide translocator 1 (ANT1)*⁸⁾, *Twinkle*⁹⁾, *DNA polymerase gamma (POLG)*¹⁰⁾ 遺伝子の変異が知られており、劣性遺伝形式では *thymidine phosphorylase 1 (TP1)* 遺伝子変異が報告されている²⁾ (表1)。また、細胞の崩壊に伴って多重欠失が2次的に起こっていると考え

えられている病態があり、late-onset mitochondrial myopathy と称される成人発症のミトコンドリアミオパチーのほか、多発性筋炎や筋緊張性筋ジストロフィーでも少量ではあるが多重欠失を認める¹¹⁾。

表1 ミトコンドリアDNAの欠乏と欠失を認める病態

欠乏状態	
乳児重症ミオパチー	脳症/筋症
乳児重症肝不全	脳症/肝不全
単一欠失/重複	
Kearns-Sayre症候群	慢性下痢/腸絨毛萎縮
慢性進行性外眼筋麻痺症候群	MELAS
Pearson症候群	ミオパチー/ニューロパチー
Wolfram症候群	尿細管機能障害/糖尿病/小失調/白質脳症
糖尿病/難聴	その他(多発性筋炎, 筋強直性ジストロフィー, 老化組織)
糖尿病/難聴/黄斑変性/白内障	
多重欠失	
慢性進行性外眼筋麻痺症候群	家族性再発性ミオグロビン尿症
慢性進行性外眼筋麻痺症候群/心筋症	MNGIE
ミオパチー(とくに遅発性)	家族性特発性心筋症
鉄芽球性貧血/ミオパチー	MERRF
進行性脳筋症	

3. リボソームRNA領域の点変異

ミトコンドリア内のリボソームRNA領域の病的変異として、A1555G変異が知られている¹²⁾。これは、アミノグリコシド系抗生物質感受性難聴の患者に認められ、わが国でも比較的頻度が高い。特徴的なことは、高音域から難聴が始まること、1回の投与だけでもその後急速に進行し、高度難聴になること、抗生物質を投与していない人でも難聴をきたすことがあること、などである。アミノグリコシド系抗生物質の投与を行うときには、詳細な問診と場合によってはこの点変異の検査が必要である。

4. 転移RNA領域の点変異

代表的な臨床病型であるMELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) やMERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers) は、それぞれロイシン(UUR)とリシン転移RNA領域の点変異が病因と認められ、その後数多くの転移RNA領域の点変異が発見された^{13,14)} (図2)。これらの点変異はほとんどがヘテロプラスミー

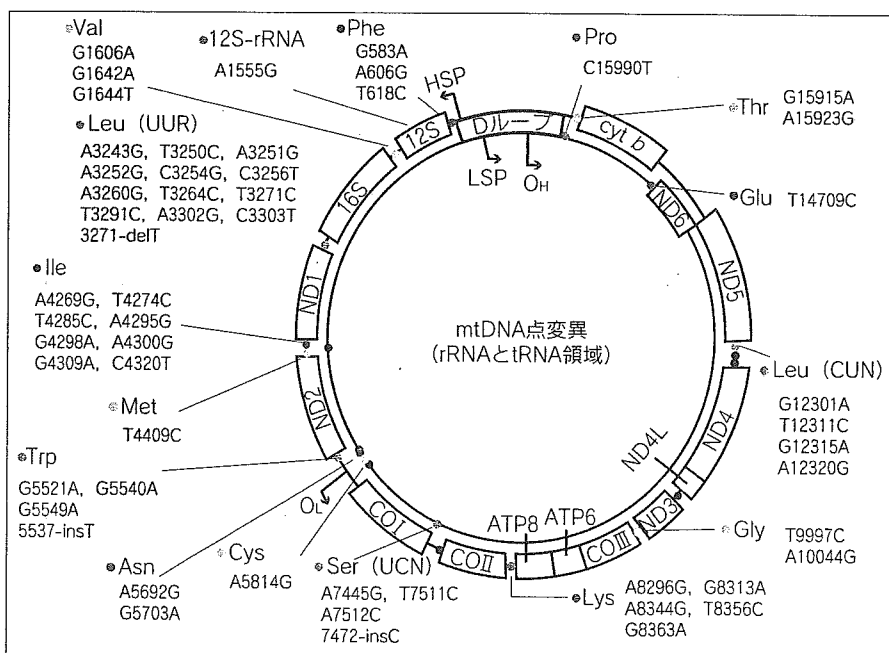


図2 リボソームRNAと転移RNA領域の病的点変異

ミトコンドリアDNAの中で認められた、リボソームRNA (rRNA) 領域と転移RNA (tRNA) 領域の点変異を示す。

で検出される。点変異の検出は、それぞれの変異に応じたミスマッチプライマーを作製し、PCRの後に制限酵素切断をすることで変異の有無を調べる方法が一般的である¹³⁾(図3)。

5. 蛋白質コード領域の変異 (図4)

蛋白質コード領域で最初に報告された点変異は、母系遺伝する夜盲を主症状とする Leber 視神経萎縮症の患者からのものである¹⁵⁾。ND4領域の11778位のGがAに変異していた。この変異はホモプラスミーで検出され、筋

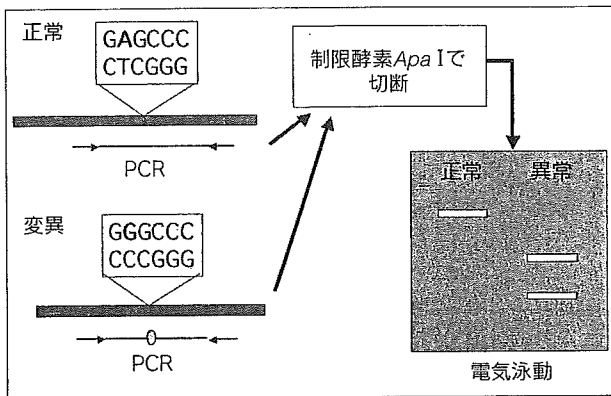


図3 PCR制限酵素切断法による点変異の検出

もっとも頻度の高い3243変異を検出する方法で、3243位の塩基がA(アデニン:正常)からG(グアニン:変異)に変化している場合、その部分を含むDNA領域をPCR法で増幅し、制限酵素Apa Iで切断すると、変異をもつDNAだけ切断される。切断されると電気泳動で簡単に検出できる。

病理では特徴的なミトコンドリア形態変化はない。ただ、ND4を含む複合体Iの機能低下を組織化学的に検出できる方法が開発されれば、形態学的に異常をとらえられなくはないだろう。同様なことは、乳児期に精神発達遅滞で発症する重症のLeigh脳症で認められるATP6領域の点変異である8993変異でもいえる¹⁶⁾。現在のところ、筋病理学的には明らかな異常をとらえられていない。したがって、このような例ではmtDNA検査が必須になる。また、COXのサブユニットの中に病的点変異が存在する場合は、COX染色で活性低下を認めるはずであり、この場合は筋病理検査が有用な情報を提供する。

6. 核DNA上の遺伝子変異

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は、複合体IのNDUFV1, NDUF54, NDUF57, NDUF58, NDUF52, NDUF51の6個に発見された¹⁷⁾。複合体Iの核由来サブユニットは三十数個知られており、これ以外のサブユニット遺伝子の変異の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、いまのところ遺伝子診断に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、心筋症の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

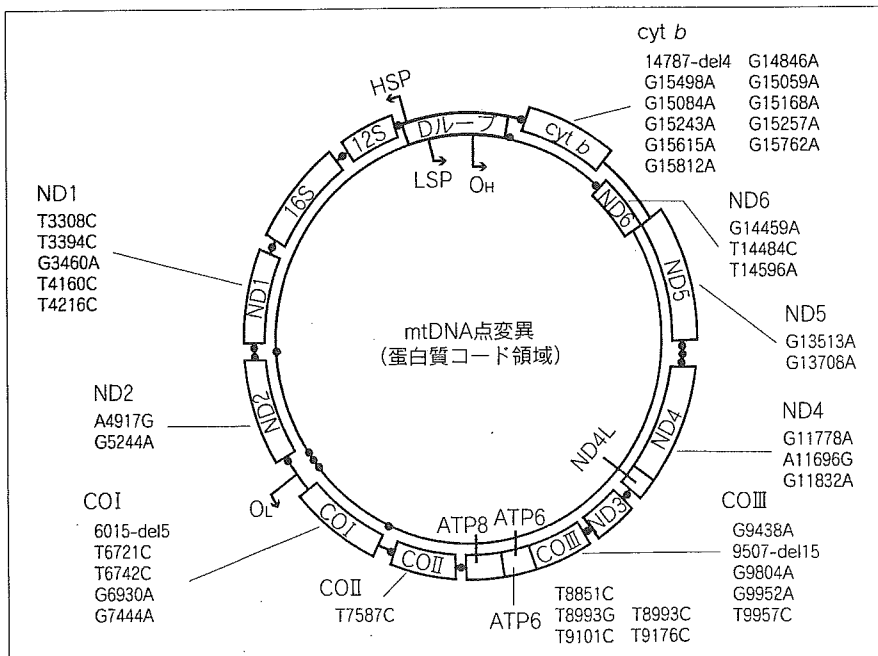


図4 蛋白質コード領域の病的点変異
ミトコンドリアDNAのなかで、蛋白質をコードしている部分に存在する点変異を示す。

ードしているSDHA遺伝子の変異が報告された¹⁸⁾。

電子伝達系酵素複合体サブユニットそのものではなく、集合にかかわる因子の遺伝子異常も報告されている。その代表は、COX欠損を伴うLeigh脳症で認めるSURF-1変異である¹⁹⁾。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。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SCO2²⁰⁾、肝不全を伴う脳筋症患者でSCO1²¹⁾、また別の脳筋症患者でCOX10の遺伝子変異が報告された²²⁾。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²³⁾。

ミトコンドリアDNAの維持・複製にかかわる核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。これらはすでに、多重欠失と欠乏状態の項で述べた。

■おわりに■

mtDNAの異常は、ここで述べたミトコンドリア病に留まらず、癌組織でmtDNA変異が蓄積しているとか、老化現象の原因になっているとか、新たな知見が出てきている。今後も種々の病態にmtDNA異常がかかわっていることが明らかになっていくと考えられ、その研究の

重要性は疑いない。

文 献

- 1) Moraes, C. T. *et al.* : *Am. J. Hum. Genet.*, 48, 492-501 (1991)
- 2) Nishino, I., Spinazzola, A., Hirano, M. : *Science*, 283, 689-692 (1999)
- 3) Saada, A. *et al.* : *Nat. Genet.*, 29, 342-344 (2001)
- 4) Mandel, H. *et al.* : *Nat. Genet.*, 29, 337-341 (2001)
- 5) Dalakas, M. *et al.* : *N. Engl. J. Med.*, 322, 1098-1105 (1990)
- 6) Holt, I. J., Harding, A. E., Morgan-Hughes, J. A. : *Nature*, 331, 717-719 (1988)
- 7) Poulton, J., Deadman, M. E., Gardiner, R. M. : *Lancet*, i, 236-240 (1989)
- 8) Kaukonen, J. *et al.* : *Science*, 289, 782-785 (2000)
- 9) Spelbrink, J. N. *et al.* : *Nat. Genet.*, 28, 200-201 (2001)
- 10) Van Goethem, G. *et al.* : *Nat. Genet.*, 28, 211-212 (2001)
- 11) Johnston, W., Karpati, G., Carpenter, S., Arnold, D., Shoubridge, E. A. : *Ann. Neurol.*, 37, 16-23 (1995)
- 12) Prezant, T. R. *et al.* : *Nat. Genet.*, 4, 289-294 (1993)
- 13) Goto, Y., Nonaka, I., Horai, S. : *Nature*, 348, 651-653 (1990)
- 14) Shoffner, J. M. *et al.* : *Cell*, 61, 931-937 (1990)
- 15) Wallace, D. C. *et al.* : *Science*, 242, 1427-1430 (1988)
- 16) Holt, I. J. *et al.* : *Am. J. Hum. Genet.*, 46, 428-433 (1990)
- 17) Schuelke, M. *et al.* : *Nat. Genet.*, 21, 260-261 (1999)
- 18) Bourgeron, T. *et al.* : *Nat. Genet.*, 11, 144-148 (1995)
- 19) Zhu, Z. *et al.* : *Nat. Genet.*, 20, 337-343 (1998)
- 20) Papadopoulou, L. C. *et al.* : *Nat. Genet.*, 23, 333-337 (1999)
- 21) Valnot, I. *et al.* : *Am. J. Hum. Genet.*, 67, 1104-1109 (2000)
- 22) Valnot, I. *et al.* : *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1245-1249 (2000)
- 23) De Lonlay, P. *et al.* : *Nat. Genet.*, 29, 57-60 (2001)

日本臨牀 63 卷 増刊号 12 (2005 年 12 月 28 日発行) 別刷

遺伝子診療学

— 遺伝子診断の進歩と遺伝子治療の展望 —

A. 遺伝子診断 (genetic diagnosis)

(遺伝学的検査 genetic testing, 遺伝子検査 gene-based testing,
核酸検査 nucleic acid-based testing)

I. 総 論

遺伝疾患の分類と分子遺伝学的発症機構

ミトコンドリア遺伝病

後藤雄一

A. 遺伝子診断 (genetic diagnosis)

(遺伝学的検査 genetic testing, 遺伝子検査 gene-based testing, 核酸検査 nucleic acid-based testing)

I. 総論

遺伝疾患の分類と分子遺伝学的発症機構

ミトコンドリア遺伝病

Mitochondrial genetic diseases

後藤雄一

Key words : ミトコンドリア DNA, 母系遺伝, ボトルネック効果, ヘテロプラスミー, 閾値効果

はじめに

ミトコンドリア病は細胞小器官であるミトコンドリアの機能異常に起因する病気であり, 多種多様な症状を引き起こす。その理由は, ミトコンドリアが成熟赤血球とケラチノサイト以外の細胞に必ず存在しており, ミトコンドリア機能異常が細胞死や細胞のもつ機能に障害を与えるからである。特に, エネルギー依存度の高い細胞(筋細胞, 神経細胞, 心筋細胞など)はその障害が現れやすく, 骨格筋, 中枢神経, 心などはその代表である。

本稿では, ミトコンドリア病の中でも, ミトコンドリア DNA(mtDNA)異常によって起きる病気をミトコンドリア遺伝病としてとらえ, その解説を行う。

1. ミトコンドリア病を起こす遺伝子異常

ミトコンドリア病の原因は, 大きく分けて, mtDNA異常によるものと核DNA上にコードされている遺伝子変異によるものがある(図1)。

a. mtDNAの異常

実際の患者に認められる mtDNA 異常には, 量的異常と質的異常がある。量的異常とは, mtDNA 欠乏状態のことである。この病因は遺伝的な場合と後天的な場合との2つがあり, 遺

伝的には乳幼児期に肝不全や腎不全で死亡した家系や, また後天的には AIDS の治療に用いられる AZT によるものが有名である。

mtDNA の質的異常には, 点変異と構造異常(欠失/重複)がある。点変異は, 存在する領域によって, 転移 RNA 領域とそれ以外(リボソーム RNA および蛋白領域)とに分けられる。転移 RNA 領域に変異をもつ患者では, 筋病理学的に ragged-red fiber (RRF) などの形態異常を示すことがほとんどであり, 比較的診断が容易であったことが多くの変異が同定された要因である。臓器症状が多彩で, 症例ごとで違いが著しいという特徴を有している。一方, 転移 RNA 以外の領域の点変異は, 筋病理学的に異常所見が乏しく, ミトコンドリア異常を確実に証明することが困難であったことから, 病因としての点変異の確認数は少なかった。しかし, 最近の研究により病因的変異の確定は不十分のものもあるものの, この領域に数多くの点変異が報告されている。その代表は Leigh 脳症と Leber 遺伝性視神経萎縮症で認められる点変異であり, これらの患者は比較的均一の臨床症状を示す。

点変異と異なり, 構造異常の欠失と重複は, その遺伝形式が複雑である。欠失には, 単一欠失と多重欠失があるが, 単一欠失は, ヒトの病気で発見された最初の mtDNA 異常で, 慢性進

Yu-ichi Goto: National Institute of Neuroscience, NCNP 国立精神・神経センター神経研究所

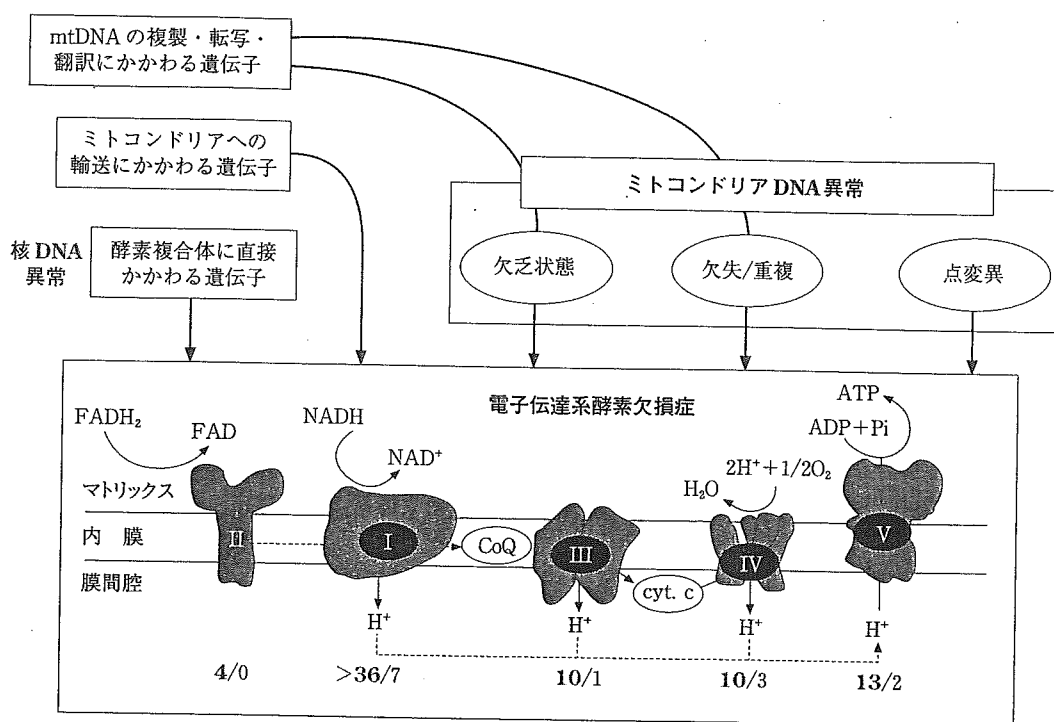


図1 ミトコンドリア病の病因

ミトコンドリア病の病因には核 DNA と mtDNA がある。mtDNA は、電子伝達系酵素複合体のうち、複合体 II を除く 4 つの複合体サブユニットの一部をコードしているので、mtDNA 異常は電子伝達系酵素欠損症として表現される。mtDNA の異常には量的異常の欠乏状態と質的異常の欠失/重複と点変異がある。また、興味深いことに、mtDNA の複製や維持にかかわる核 DNA 上の遺伝子変異により、2 次的に mtDNA 異常(多くは欠乏状態、多重欠失)が起き、それが病気の原因となるという病態もある。この場合は、上位の核 DNA 上の遺伝子変異の遺伝形式となるため、常染色体優性もしくは劣性遺伝となる。

行性外眼筋麻痺症候群 (chronic progressive external ophthalmoplegia: CPEO) や Kearns - Sayre 症候群の臨床症状をもつ患者で認められる。これらの患者は散発性で、恐らく突然変異によるであろうと考えられた。しかし、多重欠失を認める常染色体優性遺伝の大家系が報告され、この場合は mtDNA の安定性や複製機構に障害を及ぼす核 DNA 異常が想定された(後述)。

また、重複をもつ患者が報告され、この場合も当初は突然変異であろうと考えられていたが、後になって母と子が同じ重複をもっている家系が報告され、一部の重複例は母系遺伝したものと考えられている。しかし、なぜ重複が子に伝わりやすいのかの機序は今のところ不明である。

b. 核 DNA 上の遺伝子変異

ミトコンドリア内に存在している電子伝達系

酵素蛋白をコードする核 DNA 上の遺伝子変異が報告されている。複合体 II のサブユニットである *SDHA* 遺伝子変異(複合体 II 欠損症)、複合体 I のサブユニットである *NDUFS4*, *NDUFS7*, *NDUFS8*, *NDUFV1* などの遺伝子変異(複合体 I 欠損症)、ミトコンドリア輸送蛋白の一つである *DFN1* 遺伝子変異(ジストニア、難聴症候群)などである。また複合体 IV のアッセムブリーにかかわると考えられている *SURF1*, *SCO1*, *SCO2*, *COX10* 遺伝子の変異(複合体 IV 欠損症)が報告された。

更に mtDNA の維持や複製に直接影響を与える核 DNA 上の遺伝子の変異が次々と明らかにされている。重篤な消化管症状を伴うミトコンドリア脳筋症で常染色体劣性遺伝と mtDNA の多重欠失を伴う MNGIE (mitochondrial neu-

rogastrintestinal encephalomyopathy)では、thymidine phosphorylase 1 (*TPI*)内の遺伝子変異と活性低下が示されている。また、常染色体優性遺伝形式のmtDNA多重欠失を示す家系から、adenine nucleotide translocator 1 (*ANT1*)遺伝子、DNAポリメラーゼ γ 遺伝子 (*POLG*)、*Twinkle* 遺伝子に変異が同定されている。これらでは、核DNA変異とmtDNA異常が同時に存在することになる。

2. mtDNAの特徴と遺伝形式

mtDNAは、約16,500余りの塩基からなる環状二本鎖DNAであり、ミトコンドリア内で蛋白を合成するための2個のリボソームRNA、22個の転移RNAをコードしている。更に、電子伝達系酵素群のサブユニットの一部を構成する蛋白を計13個コードしている。核DNAと大きく異なる性質として以下の3つがあげられる。

a. マルチコピー性

1つの細胞内に数十～数百個存在する個々のミトコンドリア内に、mtDNAは5～10個ずつ存在しているため、1細胞では数百～数千個存在することになる。このマルチコピー性という性質は、患者で認める野生型と変異型が細胞内に混在するヘテロプラスミーという現象と密接に関係がある。また、ミトコンドリアは成熟骨格筋細胞のように筋原線維の構造に取り込まれその存在場所が固定されているが、そうでなければ、ミトコンドリアは細胞内で融合と分離を常時繰り返しており、1細胞内のヘテロプラスミーの比率はほぼ平均化されていると考えられている。

b. 易変異性

mtDNAは、核DNAに比べ変異の起こりやすさが5～10倍高いとされている。その理由は、ミトコンドリア内で変異原性のある活性酸素に曝露されていること、DNA損傷に対する修復機構が核に比べて弱いことなどがあげられている。したがって、この易変異性は、実際の患者においては突然変異という形で現れてくる。その代表例がmtDNAの欠失であり、その多くが散發性である。また、欠失がどの時点で起こっ

たのかについては明らかにできていないが、健常女性から採取した未受精卵を用いた研究で、その卵からも欠失がわずかながら検出されたという報告がある。一方で、すべての卵に欠失が存在すると仮定すると、欠失をもつ患者がなぜこれほど頻度が少ないのか新たな疑問になり、この点を明らかにするような欠失の出現、増幅、維持に関する研究が今後重要になると考えられる。

c. 細胞質遺伝

細胞分裂の際、核DNAは正確に複製が行われ、娘細胞には同一のDNAが伝わっていくのが原則である。それとは違って、mtDNAはミトコンドリア内に存在し、もしmtDNAのヘテロプラスミーがある場合は娘細胞に伝わる変異型mtDNAの割合は予測不能で、統計学的な分離(stochastic segregation)が起きる。また、遺伝物質が細胞質に存在するミトコンドリアにあるという意味で細胞質遺伝という用語も用いられる。

この細胞質遺伝が生殖細胞ではどのような現象になるかを考える。未受精卵には約10万個のmtDNAが存在する。一方、精子にはわずかのミトコンドリア(とmtDNA)しか存在していない。よって受精の際には、精子由来のミトコンドリアは卵の中に侵入しないか、もし侵入したとしてもそのミトコンドリア自体が消失する現象が知られている。この精子(父)由来ミトコンドリアの消失機序の詳細は不明である。結局、受精卵のミトコンドリア(とmtDNA)はすべて卵(母)由来となり、もしもとも未受精卵の中に変異mtDNAが存在し、その後の発生段階で有意な比率になれば病気を発症することになる。これが母系遺伝である。

このようにヒトでは母系遺伝はあっても、父系遺伝はないとされているが、実はハエやマウスなどでは父系遺伝の例が報告されている。そしてつい最近になって、ヒトのミトコンドリア病患者で父系遺伝と考えられる症例の報告があった¹⁾。症例は、軽い運動でも乳酸値が上昇する強い易疲労性を訴える男性(28歳)で、両親、妹は健康である。筋生検でRRFを15%認め、

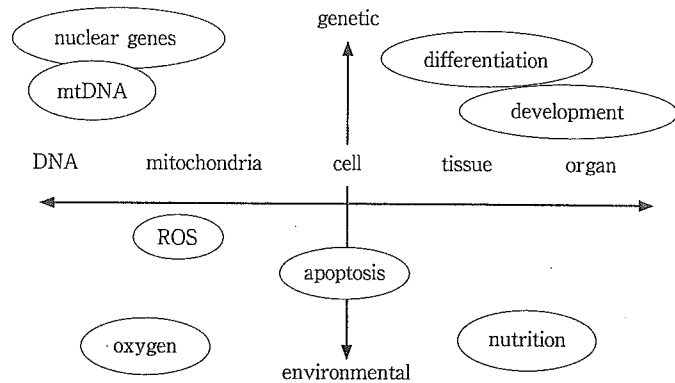


図2 変異率の変動にかかわる因子

変異率の変動にかかわる主な因子をDNAから個体までの形態レベルの軸と遺伝か環境かという要因による軸上に表現した。ROS: 活性酸素。

生化学的に複合体I欠損を示した。mtDNA検査の結果、ND2 遺伝子内に2塩基の欠失が見つかり、この変異は血液で10%、筋肉で90%のヘテロプラスミーであった。そして、この部位以外の領域の塩基配列を調べたところ、筋肉のmtDNAでは父と同じ多型が見つかり、血液のmtDNAでは母と同じ多型が見つかった。すなわち、病因と考えられる2塩基の欠失は父由来のmtDNA上に存在していたと考えるのが妥当であった。なぜ、筋肉だけに父由来のmtDNAが存在したのかについては全く不明であるが、著者らは、受精した精子のmtDNAにはもともと2塩基の欠失が生じており、それが受精時に消失せずに残り、しかもそれらが筋肉で有意な比率で存在したというメカニズムを推測している。しかし、その根拠は明確ではないし、その後の別の複数のグループの研究でも同様な例は見つかっておらず、現状では極めてまれな現象であると考えられる。

3. 変異 mtDNA の蓄積とその効果

a. 閾値効果と細胞障害性

ヘテロプラスミーの状態で存在している変異 mtDNA は、その比率が低いときはミトコンドリア機能に影響を与えない。しかし、ある一定の値(閾値という)以上になると、機能障害が現れてくる。このような閾値効果は、生化学的に

も、病理学的にも確かめられており、逆にいうと閾値以下の変異率であれば変異 mtDNA を有していても機能障害を免れていることを意味する。これは臨床的にも重要な所見であり、遺伝子検査で変異 mtDNA が検出されても、病気と関係ない場合もあり得るということである。

一方で、これまでのミトコンドリア機能といえばエネルギー産生能を調べることであったが、実際のミトコンドリアにはそれ以外に活性酸素産生やカルシウムイオン調節などの働きがあり、これらの現象における閾値がどの程度であるかはまだよくわかっていない。エネルギー産生が低下する場合より低い閾値でこれらに影響が出ている可能性が否定できない。その意味で、ミトコンドリア病以外の Parkinson 病、Alzheimer 病などの神経変性疾患、糖尿病、高血圧などの生活習慣病にもミトコンドリア機能異常がかかわっていることが次第にわかってきている。

b. 変異率変動要因とボトルネック効果

変異 mtDNA の比率を変動させるものとして、形態的なレベルと遺伝/環境レベルという2つの軸からなる場に位置づけられる種々の要因があげられる(図2)。これらの要因が細胞内の変異 mtDNA の比率の変動に効いてくるには、変異 mtDNA の優先的増幅や mtDNA の損傷出現などの DNA レベルの効果や、細胞分裂や細胞死などの細胞レベルの効果などに直接的または

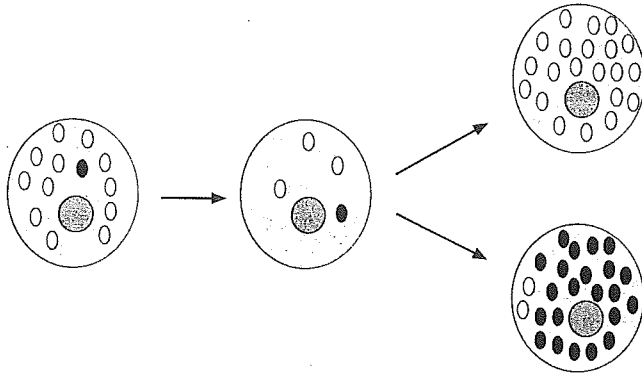


図3 ボトルネック効果

通常のミトコンドリア(と mtDNA)の数が著しく減少すると、その後の数の回復過程で変異 mtDNA が爆発的に優位になる可能性がある。このような現象をボトルネック効果という。

間接的にかかわることが必要である。この比率決定に関する要因の研究は、ミトコンドリアの病理を理解し治療法を開発することに極めて重要であるものの、まだよくわかっていないことが多い。最近、細胞特異的にある種の mtDNA を優先的に増殖させる因子の存在が示されたり²⁾、活性酸素が欠失 mtDNA の増加を促す証拠などが得られたりしている³⁾。

その中でも、比率を大きく変動させる要因として最も知られているのがボトルネック効果である(図3)。これは、細胞内のミトコンドリア(と mtDNA)の数が減少すると、通常ではほとんど比率に影響を与えないわずかな変異率の変化がその後の比率変動に大きく影響するということである。例えば、1,000 個ある mtDNA の中の 1 個の mtDNA に新たな変異が生じて 0.1% の変化であるが、もし 50 個の mtDNA であれば 2% の変化となり、その後の mtDNA 数の回復の過程で変異 mtDNA が何らかの理由でより優先的に増えると比率が大きく上昇する可能性がある。臨床的にも、Leigh 脳症を起こす 8993 変異が 1 人の母から複数の子に種々の比率で伝わることを示されている。この場合、卵母細胞が著しくその数を増やすときに遺伝的なボトルネックがあると考えられており、成熟排卵前卵には種々の比率を有するものが存在し、どの卵が受精するかで子に伝わる比率がほぼ決まっ

てしまう。

4. 病型と遺伝形式

ミトコンドリア病の臨床病型は様々なものがあり、ここで詳細を解説できないが、主なものとして MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes), MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers), CPEO, Leigh 脳症などがある。これらの病型を示す遺伝子異常は一定していないが、まとめると表 1 のようになる。このように、臨床病型から遺伝形式が判明しないという点はミトコンドリア病の特徴であり、遺伝形式が明らかになるので mtDNA 検査を含めた遺伝子検査の臨床的意義は大きいと考える。ただし、母系遺伝については、その臨床的意義を患者やその家族に正確に説明する必要があり、言葉が一人歩きして、母や母方親族に無用な不安や負担をかけることのないように努めるべきである。その意味で検査前遺伝カウンセリングの必要性和重要性を再確認すべきである。

5. 今後の mtDNA 検査の方向性と遺伝子治療の可能性

a. 今後の mtDNA 検査

ミトコンドリア病の臨床症状の多様性、類似

表 1 主な臨床病型の遺伝形式

MELAS	→ 80%以上は母系遺伝, 残り核性?
MERRF	→ 80%以上は母系遺伝, 残り核性?
慢性進行性外眼 筋麻痺症候群 (CPEO)	→ 単一欠失: ほとんどが突然変異 重複あり: ほとんどが突然変異 ときに母系遺伝 多重欠失: 大部分が突然変異 ときに常染色体優性/劣性
Leigh 脳症	→ mtDNA 点変異: 母系遺伝, まれに突然変異 核遺伝子判明: 常染色体劣性, X 連鎖劣性 核遺伝子不明: 恐らく常染色体劣性

した病型でもいろいろな遺伝子異常があり得ることなどから, mtDNA 検査はより網羅的に行わなければならないであろう。そうすると多数の変異を同時に検出できる安価な検査法を開発することが必要になる。

一方で, 変異 mtDNA はヘテロプラスミーで存在していることが多く, しかも罹患臓器ではない血液を用いた検査を行わなければならない場合, その変異率はかなり低い可能性がある。また, 罹患臓器を検査対象とする場合でも変異率をある程度正確に求めることが必要になる。その意味で, 検出限界を下げることに同時に, 変異率の正確な測定ができる方法が必要になるであろう。

出生前診断は, 基本的にヘテロプラスミーで発症する MELAS や MERRF ではその適応ではない。なぜなら, 絨毛細胞や羊水細胞での変異率からその後の発症を予測することが不可能であるからである。しかしながら, ほぼホモプラスミーで発症する 8993 変異による Leigh 脳症の場合は適応になる。

b. 遺伝子治療の可能性

mtDNA はミトコンドリア内に存在するという現実のために, なかなか mtDNA を直接改変させる方法が確立できないでいる。しかも mtDNA の複製や mtDNA 数の調節を行っている機構についても未知の部分が多い。変異 mtDNA を正常に復する方法を獲得するには, 更なる基礎研究が必要である。一方で, ヘテロプラスミーで発症している病気の場合, その変異率を人為的に低下させることができれば, 理論的に治療と発症予防が可能になる。この方針の下で, 変異率変動因子の全容を解明し, 変動因子の調節を行う方法を臨床に応用する研究が重要であると考えられる。

おわりに

ミトコンドリア病は核 DNA 上の遺伝子と mtDNA の双方の異常で起きるが, mtDNA のもつ特殊性から核 DNA とは全く異なるアプローチが必要になる。しかし, 基礎研究と臨床研究とのタイアップで, 新たな診断法や治療法の開発が可能になるものと期待する。

■ 文 献

- 1) Schwartz M, Vissing J: New patterns of inheritance in mitochondrial disease. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 247-251, 2003.
- 2) Battersby BJ, et al: Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. *Nat Genet* 33: 183-186, 2003.
- 3) Schriener SE, et al: Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308: 1909-1911, 2005.