

長鎖脂肪酸代謝異常症の遺伝学的検査実施時の倫理的配慮について

研究分担者 奥山虎之 国立成育医療研究センター 臨床検査部長

研究要旨

脂肪酸代謝異常症のような新規の新生児マススクリーニング対象疾患における長期追跡調査を可能にする体制を検討した。小児慢性特定疾患、新薬の市販後調査、製薬企業の支援による登録事業、公的研究事業による研究・追跡事業など既存の体制について検討したが、適切な登録・追跡事業としては、いずれも多くの問題や課題が指摘された。新生児マススクリーニング事業と先天代謝異常学会のような関連学会が協力して、あらたな体制の確立が必要であると考えられた。

A. 研究目的

脂肪酸代謝異常症のような先天性希少難病においては、わが国における患者数、個々の患者の治療や管理の実態を把握することは容易ではない。新生児マススクリーニング対象疾患となったことによって、脂肪酸代謝異常症の実態把握は進展することが期待されるが、研究終了後の長期フォローアップによる継続的な患者実態調査も考慮しなければならない重要な課題である。本分担研究では、希少難病の長期追跡調査を可能にする既存のシステムについて、それらの利点や問題点を把握し、それをもとに脂肪酸代謝異常症のような先天性希少難病の適切な患者実態調査のあり方を検討する。

B. 研究方法

先天性小児希少難病の長期追跡調査を可能とする既存のシステムについて、それらの利点や問題点を抽出する。それをもとに、脂肪酸代謝異常症のような先天性希少難病の適切な患者実態調査のあり方を検討する。

（倫理面への配慮）

本研究では、個人情報やインフォームドコンセントを必要とする患者検体の取り扱いおよび動物実験などを必要としないため、特に倫理面での問題はない。

C. 研究結果

先天性希少難病の既存の登録・フォローアップシステムとしては、小児慢性特定疾患、新薬の市販後調査、製薬企業の支援による登録事業、公的研究事業による研究・追跡事業などがある。以下、それぞれの問題点について記述する。

1. 小児慢性特定疾患：

特定疾患の医療費助成を目的とした制度である。全国規模、幅広い疾患での臨床情報の収集が可能であるが、臨床情報の研究利用などについては明確な規定がない。

2. 新薬の市販後調査：

先天性希少難病においては、新薬が承認されると、使用全例で長期間の市販後調査が義務づけられる場合が多い。しかし脂肪酸代謝障害については、現時点で画期的な新薬が臨床開発されていない状況であり、この制度を使った登録追跡事業の展開は期待できない

3. 製薬企業等の支援による登録事業：

治療薬を製造・販売している製薬企業のサポートで行われる登録追跡事業がある。ムコ多糖症Ⅰ型の酵素療法製剤を販売しているジェンザイム社がサポートしている登録事業 MPSI Registry などがある。希少疾患の登録に欠かせない世界規模の対応ができるだけの十分な資金力が与えられるという利点があるが、当該企業が推進する治療法以外の治療法を詳細に検討することは困難である。先に述べたと

おり、脂肪酸代謝障害については現時点で画期的な新薬が臨床開発されていない状況であり、この制度を使った登録追跡事業の展開は期待できない。

4. 公的研究事業による研究・追跡事業：

成育医療研究開発費による研究事業に「先天代謝異常症に対する登録・追跡」事業があるが、規模は小さく、対象疾患も限定されている。しかし有機酸代謝障害とともに、脂肪酸代謝障害も対象疾患に組み入れられていることを考慮すると、もっとも有望なシステムと考えられる。

D. 考察

上記のように、現時点では成育医療研究開発費による研究事業である「先天代謝異常症に対する登録・追跡」事業を基盤として、脂肪酸代謝異常症の登録事業を展開することがもっとも有望と考えられた。しかし現行の同研究事業では、日本先天代謝異常学会などの関連学会や新生児マススクリーニング事業などとの連携が不十分なので、この点に関する改善が急務である。

E. 結論

脂肪酸代謝異常症のような新規の新生児マススクリーニング対象疾患における長期追跡調査においては、日本先天代謝異常学会などの関連学会や新生児マススクリーニング事業などとの密接な連携のもとで成育医療研究開発費による研究事業の一環として行うことが望ましい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Oda E, Tanaka T, Migita O, Kosuga M, Fukushi M, Okumiya T, Osawa M, Okuyama T. Newborn screening for Pompe disease in Japan. *Mol Genet Metab*. 2011, 104:560-565.

Furujo M, Kubo T, Kosuga M, Okuyama T. Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in two Japanese siblings with mucopolysaccharidosis type VI. *Mol Genet Metab*. 2011.104:597-602.

2. 学会発表

Motomichi Kosuga, Eri Oda, Toju Tanaka, Kazuhiro Kida, Torayuki Okuyama. The Feasibility of Newborn Screening for Pompe Disease in Japanese Population. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research Hosted with the pediatric Academic Societies' Annual meeting. Denver, USA. April 30, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

タンデムマスを使用した新生児拡大マススクリーニングにて発見される
長鎖脂肪酸代謝異常症のフォローアップ体制の整備に関する研究

分担研究者： 高柳 正樹（千葉県こども病院副院長）

研究要旨

タンデムマスを使用した新生児拡大マススクリーニングが全国的に広く実施されてきている。この新生児拡大マススクリーニングにおいては、長鎖脂肪酸代謝異常のなかでカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損症1、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ2酵素欠損症と極長鎖脂肪酸脱水素酵素欠損症とがスクリーニングされている。今後この新生児拡大マススクリーニングの効果を上げていくためにも、発見された患者の正確な診断と的確な治療管理（フォローアップ）について検討した。

A. 研究目的

タンデムマスを使用した新生児拡大マススクリーニングが全国的に広く実施されてきている。この新生児拡大マススクリーニングにおいては、長鎖脂肪酸代謝異常3疾患がスクリーニングされている。今後この新生児拡大マススクリーニングの効果を上げていくためにも、発見された患者の的確な治療管理（フォローアップ）について検討した。

B. 研究方法

的確な治療管理（フォローアップ）をおこなうための必要な要件について、これまでの経験症例や文献から整理して考察をおこなった。

（倫理面への配慮）

個人の氏名、診断名がわかるような表現は行っていない

C. 研究結果

今後この新生児拡大マススクリーニングの効果を上げていくためにも、発見された患者の正確な診断と的確な治療管理（フォローアップ）は必要なことは言うまでもない。

このためには以下の要件が必須であると考える。

患者を適切に管理するために必要な医療環境の整備が必要である

1. かかりつけ医

予防接種、感冒り患時の対応

2. 24時間対応の小児救急医療おこなっている病院

急性増悪時の治療管理

3. 代謝異常症専門医のいる医療施設

治療戦略の立案と実行

これらの医療施設間の連携を有効に実施するための問題点としては以下のようなことがあげられる。

1. 非常に特殊な病気なので開業の医師も救急病院の医師も全く経験のないことが普通である。
2. 開業の先生には疾患の急性増悪時の症状を詳しく説明してある紹介状が必須である。
3. 救急対応病院には具体的な治療法を説明したものをお送りし、さらに同じものを患者にいつも持参させる指示が必要である。
4. 救急病院には患者の状態が搬送に耐えれば、いつでも代謝異常専門医のいる病院へ移送していただきたい旨を通知しておく必要がある。
5. フォロー中の患者のデータの共同管理法などの検討が必要である。

治療を受ける患者側にも多くの問題点があると思われる。患者家族の抱えている主な問題点を厚労省 山口研究班 タンデムマス等の技術を導入した新しい新生児マススクリーニング体制の確立に関する研究 平成19年ー21年度総合研究報告書より抜粋すると以下の様になる。

1. 患者の発達、疾病、治療等に関する情報と情報交換の場の不足
2. 薬剤等の治療に関する不安
3. 生涯続く経済的負担とその地域格差
4. 就学、進学、就労に関する問題
5. 介護による家族の社会参加の制限
6. 患者とその兄弟の将来の不安
7. 要望とその他の意見

D. 考察

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

今後拡大新生児マススクリーニングにて発見された患者は、代謝異常症にたいして経験のない小児科医と先天代謝異常症の専門家とが、協力して治療管理していくことが必要になるとと思われる。このようか協力体制がない限り、発見された患者をうまく治療管理していくことは難しいものになるとと思われる。

これらの一般小児科医に対する情報の提供は専門家が行うのだが、かなりの負担になると予想される。全国の先天代謝異常症の専門家が協力してこれらの情報を整理して、インターネットなどで一般小児科医が容易に情報にアクセスできる環境を構築すべきと考える。こうすることによって個人の負担は軽減されると思われる。

上記の問題を解決するためには以下のような解決策が考えられる。

1. 疾病、治療、予後に関する情報開示
2. 患者家族間、さらに患者と医療者による直接的な情報交換の場
3. ネットによる窓口支援システム
4. 患者家族のネットワーク構築
5. 医師、看護師、栄養士などによるチーム医療推進
6. 教育や就労関係者への啓発
7. 市民による国への請願
8. 支援のための法的制度の整備
9. 研究推進による治療法の開発

これらの問題を一つ一つ着実に解決していく努力が、医療者側、患者側、行政、製薬会社のそれぞれに求められると考える。

E. 結論

これまで述べた問題点を一つ一つ着実に解決していく努力が、医療者側、患者側、行政、製薬会社のそれぞれに求められると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N. Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation. *Tohoku J Exp Med.* 2010;221(3):191-5.

Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S. Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase capital I, Ukrainian (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain Dev.* 2010;32(5):409-11. Epub 2009 Apr 3. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究課題：タンデムマス法によって発見された長鎖脂肪酸代謝異常症例の検討

研究分担者 長谷川有紀 島根大学医学部小児科助教

研究要旨

タンデムマス法を用いて診断が可能な長鎖脂肪酸代謝異常症のうち、島根大学では極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症 11 例、ミトコンドリア三頭酵素 (TFP) 欠損症 4 例、CPT-1 欠損症 1 例、CPT-2 欠損症 4 例を診断している。昨年度は VLCAD 欠損症の自然歴を明らかにしたが、今年度は VLCAD 疾患の遺伝子解析から日本人症例における特徴の有無について検討した。VLCAD 欠損症 11 例のうち 9 例で遺伝子解析を行い、全 18 alleles 中 6 alleles に 997 ins T を認めた。この mutation は重症型に関わらず認められた。また骨格筋型 4 例では、8 alleles 中、K264E と K382Q の変異をそれぞれ 3 alleles と 2 allele ずつ発見した。既報告例でもこれらの mutation が骨格筋型で多く発見されており、日本人症例では hot spot である可能性が示唆された。また、他の長鎖脂肪酸代謝異常症の自然歴についても調査を行い、新生児タンデムマス・スクリーニングの有用性を検討した。

A. 研究目的

長鎖脂肪酸代謝異常症には、1) 出生直後から心筋障害を生じて死亡率の高い新生児型、2) 乳幼児期に低血糖や肝障害で発症することの多い中間型、3) 幼児期以降に横紋筋融解症などの骨格筋症状を呈する骨格筋型の 3 つの重症型がある。タンデムマスによる診断が増加しているが、我が国における重症度の特徴を明らかにしたものはまだない。昨年は VLCAD 欠損症の自然歴を検討したが、今年度は他の長鎖脂肪酸代謝異常症について自然歴を検討した。また、昨年までに診断された VLCAD 欠損症例について遺伝子解析を行い、変異に特徴があるか、genotype-phenotype の関連についても検討を行った。

B. 研究方法

1) VLCAD 欠損症以外の長鎖脂肪酸代謝異常症例の自然歴の検討

TFP 欠損症など 2011 年までに島根大学で診断された長鎖脂肪酸代謝異常症例の自然歴を検討し、重症度に特徴があるかを検討した。

2) VLCAD 欠損症例の遺伝子解析と phenotype-genotype の関連についての検討

2010 年までに島根大学で診断された 11 症例のうち、遺伝子解析の同意が得られた 9 症例について遺伝子変異を明らかにし、さらに既報告例もふくめて、phenotype-genotype の関連を検討した。

(倫理面への配慮)

検体については診断が治療に有用な情報を与えるため、連結匿名化で分析を行った。遺伝子解析については患者もしくは家族に対して十分なインフォームド・コンセントを行い、解析に同意を得た。その他「臨床研究に関する倫理指針」に基づき、患者の個人情報について管理を行った。

C. 研究結果

1) VLCAD 欠損症以外の長鎖脂肪酸代謝異常として、TFP 欠損症 4 例、CPT-1 欠損症 1 例、CPT-2 欠損症が 4 例であった。うち新生児タンデムマス・スクリーニングで発見された症例は CPT-1 欠損症の 1 例であった。全部で 9 症例のうち、TFP 欠損症の 2 例と CPT-2 欠損症の 1 例は新生児期早

期に発症する重症型で、いずれも発症1ヶ月以内に死亡していた。また中間型2例で、いずれも感染時の低血糖発作から高アンモニア血症、意識低下などを生じて診断された。その他、3例は横紋筋融解症を契機に診断されていた。しかしうち1例は後に、生後1か月時にALTEと診断されていたことが明らかとなった。本症例は骨格筋型というより、当初は中間型として発症したが、年齢が長じて骨格筋症状を呈している可能性が高くなった。中間型と骨格筋型の症例はいずれも生命予後は良好であった。

2) VLCAD欠損症の遺伝子解析を行った9症例の重症度分類は、図1に示すように新生児型2例、中間型1例、骨格筋型が4例、および新生児マススクリーニングによる未発症例が2例であった。

これら全18 alleles中6 allelesに997 ins Tの変異を認めた。このmutationは重症型に関わらず認められた。また骨格筋型4例では、8 alleles中、K264EとK382Qの変異をそれぞれ3 allelesと2 alleleずつ発見した。既報告の骨格筋型17症例でもK264Eが10 alleles、K382Qが6 allelesに同定されていた。

D. 考察

VLCAD欠損症以外の長鎖脂肪酸代謝異常症でも症例は新生児型、中間型、骨格筋型のいずれかの症状を呈していた。今回発見された患者数が少なかったため、疾患ごとの臨床的特徴の傾向を明らかにすることはできなかった。しかし、骨格筋型として診断された症例が詳細な問診から乳児期にALTEを生じていたことが明らかとなり、中間型発症でも年齢の上昇とともに骨格筋型に臨床像が変化することを示唆していた。また新生児タンデムマス・スクリーニングで発見された症例はCPT-1欠損症の1例のみであったが、生活指導などを行い、現在までのところ発達は正常であった。このことは長鎖脂肪酸代謝異常におけるタンデムマス・スクリーニングの有用性を示すものと考えられる。今後も症例を積み重ねて、臨床像の特徴を明らかにしたい。

次にVLCAD欠損症患者の遺伝子解析の結果から、1)臨床像に関係なく997 ins Tの変異を高頻度に認めること、2)骨格筋型ではK264EとK382Qのpoint mutationを高頻度に認めること、が明らかとなった。日本人症例では海外に比べ骨格筋型を呈する症例数が多い傾向にあり、その原因としてK264EとK382Qのpoint mutationがhot spotである可能性を示唆していた。またframe shiftやnonsense mutationは新生児型で多く認められており、phenotype-genotypeの関連が明らかとなってきた。今後は新生児タンデムマス・スクリーニングで発見される症例の予後を予測できるかどうかも検討していきたい。

E. 結論

本研究によりVLCAD欠損症日本人症例の遺伝子変異の特徴が明らかとなった。また他の長鎖脂肪酸代謝異常症の臨床像についても検討を行った。今後、新生児タンデムマス・スクリーニングで発見が増加すると思われる未発症例について、今回の成果が予後予測に役立つかどうか、今後も検討したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagi M, Lee T, Awano H, Tsuji M, Tajima G, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Takeshima Y, Matsuo M. A patient with mitochondrial trifunctional protein deficiency due to the mutations in the *HADHB* gene showed recurrent myalgia since early childhood and was diagnosed in adolescence. *Mol Genet Metab.* 104: 556-9, 2011
- 2) Mushimoto Y, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Yamaguchi S.: Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1. *Mol Genet Metab.* 102: 343-8, 2011
- 3) 久保田一生, 深尾敏幸, 堀友博, 小林弘

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

典, 船戸道徳, 長谷川有紀, 山口清次, 近藤 1. 特許取得
直実: カルニチンパルミトイルトランスフェ 2. 実用新案登録
ラーゼ2欠損症のろ紙血血清のアシルカルニ 3. その他
チンプロファイルの経時的変化 日本小児 4. その他
科学会雑誌 115: 956-60, 2011 5. その他

H. 知的財産権の出願・登録状況

図1: 島根大学で遺伝子解析を行った VLCAD 欠損症患者9症例の解析結果と臨床像の関連

Case No.	Age at onset	Phenotype	Family history	Clinical findings					Mutation		Outcome
				Cardiomyopathy	Hepatomegaly	Hypoglycemia	Acute encephalopathy	Myalgia/Rhabdomyolysis	cDNA position	Protein	
1	2m	severe	+	+	-	+	+	-	553G>A 879ins364	G185S insertion Intron9	Dead (8m)
2	4m	severe	-	+	+	-	+	-	454G>A 997insT	G152S frameshift	Dead (5m)
3	1y4m	intermediate	+	-	+	+	+	-	997insT 1153C>T	frame shift R385W	Alive
4	1y	myopathic	-	-	-	-	-	+	790A>G 997insT	K264E frame shift	Alive
5	2y	myopathic	-	-	-	-	-	+	1144A>C 1339G>A	K382Q G447R	Alive
6	2y10m	myopathic	-	-	-	-	-	+	997insT 1144A>C	frame shift K382Q	Alive
7	20ys	myopathic	+	-	-	-	-	+	790A>G (Homozygo 997insT	K264E	Alive
8	(5d)	(no symptom)	-	-	-	-	-	-	779C>T 997insT	T260M frame shift	Alive
9	(5d)	(no symptom)	-	-	-	-	-	-	997insT 1246G>A	frame shift A416T	Alive

日本人長鎖脂肪酸代謝異常症の患者数把握と、治療指針作成および
長期フォローアップ体制確立のための研究

研究分担者 但馬 剛 広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学 助教

VLCAD 欠損症と CPT-2 欠損症の確定診断：実績と課題

研究要旨

タンデム質量分析法による VLCAD 欠損症の新生児スクリーニング陽性例および有症状精査陽性例の確定検査として、HPLC を用いた酵素活性測定を継続した。今年度は有症状精査 1 例を罹患と診断した。遺伝子解析では、昨年度までに検出されていた 2 種類の「アミノ酸置換を伴わない 1 塩基置換」について mRNA 解析を加え、スプライシング異常をもたらす変異であることを確認した。

CPT-2 欠損症については、広島県の新生児スクリーニングで見逃されて重篤な転帰を辿った前年の乳児例を受けて、陽性判定基準値を切り下げたところ、3 例の新生児が相次いで陽性となったが、いずれも遺伝子変異は検出されていない。現行の日齢 5 での採血で本疾患を見逃しなくスクリーニングするためには、低めの陽性基準に、速やかな確定・除外診断のための酵素診断法を組み合わせることが不可欠と考えられた。

研究協力者

津村弥来

(広島大学大学院小児科学大学院生)

香川礼子

(広島大学大学院小児科学大学院生)

宇都宮朱里

(広島大学大学院小児科学大学院生)

原圭一

(広島大学大学院小児科学大学院生)

岡田賢

(Laboratory of Human Genetics of
Infectious Diseases,
The Rockefeller University)

佐倉伸夫

(重症心身障害児施設鈴が峰病院長)

阪本直美

(広島市医師会臨床検査センター)

中常千代美

(広島市医師会臨床検査センター)

吉井千代子

(広島市医師会臨床検査センター)

濱川以行

(広島市医師会臨床検査センター)

A. 研究目的

極長鎖アシル CoA 脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症の国内実態把握のため、タンデム質量分析法 (以下タンデムマス) によるスクリーニング検査における陽性例の確定検査として、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いたリンパ球中の酵素活性測定と遺伝子解析を実施した。同じくタンデムマスによるスクリーニング検査でカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ -2 (CPT-2) 欠損症が疑われる症例については、遺伝子解析による確定診断を試みた。

B. 研究方法

1) 酵素活性測定 (VLCAD)

国内の血中 C14:1-アシルカルニチン陽性例について、リンパ球を粗酵素源として palmitoyl-CoA から 2-hexadecenoyl-CoA を生成させ HPLC で定量する既報の方法 (Tajima G et al.: Pediatr Res 64: 667-672, 2008) で酵素活性を測定した。

2) 遺伝子診断 (VLCAD, CPT-2)

ゲノム DNA を基に各エクソンを直接塩基配列決定法で解析した。

3) 倫理面への配慮

タンデム質量分析法による新生児スクリーニングの試験研究、および VLCAD 欠損症の遺伝子解析については広島大学倫理委員会で承認済みであり、所定の説明を行い、同意書を得た上で実施した。酵素活性測定についても、遺伝子解析について承認を受けた方法に準じて、同意書を得た上で実施した。

C. 研究結果

1) VLCAD 欠損症の診断実績（表 1, 2）

2010 年度までに新生児スクリーニング陽性 5 例と有症状精査 28 例の診断依頼があり、前者は 5 例とも罹患と判定された。後者のうち酵素活性低下を認めたのは 10 例で、16 例は除外診断され、一卵性双胎の 2 例はヘテロ保因者と考えられた。

2011 年度は有症状精査 1 例の診断依頼があり、罹患と診断した。本例は急性胃腸炎の経過中に ALTE を来した 1 歳 6 か月の男児で、外来待合中だったため辛くも後遺症なく救命されている。急性期血清のタンデムマス解析では著しい低カルニチン血症によって C14:1 を始めとする長鎖アシルカルニチンの増加がマスクされており、カルニチン補充後の再検で VLCAD 欠損症に合致する異常値が確認された。遺伝子解析では、いずれも既報である 696C>G (P266A), 1153C>T (R385W) の複合ヘテロ接合性変異が同定された。

2) *ACADVL* 825G>A (V284V) 変異の スプライシング解析結果（図 1）

患者白血球から RNA を抽出し、random primer にて total cDNA を合成後、*ACADVL* exon 7-11 を PCR 増幅・精製後、直接シーケンス法で解析した結果、正常配列 (825G) の発現だけが認められた。さらに、当該部分をベクターに組み込んで導入した大腸菌を培養し、発現している mRNA の塩基配列をコロニー毎に解析（計 60 クローン）したところ、825G を含む正常配列 (46 クローン) と、850G から exon 9 末端までの 29 塩基欠失 (14 クローン) が検出され、この同名変異はスプライシング異常を引き起こすことが確認された。

3) *ACADVL* 1332G>A (K444K) 変異の スプライシング解析結果（図 2）

患者白血球から RNA を抽出し、random primer にて total cDNA を合成後、*ACADVL* exon 11-15 を PCR 増幅・精製後、直接シーケンス法で解析した結果、正常配列 (1332G) の発現だけが認められた。さらに、当該部分をベクターに組み込んで導入した大腸菌を培養し、発現している mRNA の塩基配列をコロニー毎に解析（計 55 クローン）したところ、すべて 1332G を含む正常配列であった。以上の結果から、1332A は高率に mRNA decay をもたらす病理性変異アレルであると考えられた。

4) CPT-2 欠損症の診断実績（表 3, 4）

2010 年度には、低ケトン性低血糖症・高アンモニア血症を伴う急性脳症の 7 か月男児例と、骨格筋症状を繰り返す 2 歳女児例の遺伝子解析を行い、いずれも CPT-2 欠損症と確定診断した。第 1 例は広島県のタンデムマス新生児スクリーニングで正常と判定されており、脂肪酸代謝異常症の新生児スクリーニングで国内最初の偽陰性例となった。

本例が重篤な障害を遺残したことから、このような悲惨な見逃しを回避する方策として、本疾患の新生児濾紙血でのスクリーニング判定基準を引き下げたところ、2011 年度には広島県で新生児 3 例が陽性となり、遺伝子解析を実施したが、CPT-2 には変異が確認されていない。また、県外から横紋筋融解症を呈した 15 歳女性の疑診例について解析依頼を受けたが、これも CPT-2 変異は検出されなかった。

D. 考察と結論

今年度はタンデムマス新生児スクリーニングの未施行地域で VLCAD 欠損症の ALTE 症例が経験された。本例は長期間にわたるカルニチンの過消費によって著しい低カルニチン状態となっていたため、当初のタンデムマス解析では長鎖アシルカルニチンの上昇が見られず、カルニチン補充後に C14:1-カルニチンの上昇がやや

く明らかとなったが、安定期検体での以上度は軽微であり、反復検査で異常値が続くことを注意深く観察した上で、酵素活性測定・遺伝子解析での確定診断に至った。本例の C14:1-カルニチン測定値は、これまでケトン性低血糖による偽陽性例などでもしばしば経験されてきたレベルに留まっており、酵素活性測定が速やかな診断確定に有用であった。また、本例の家族歴には新生児期に突然死した同胞例もあり、病理標本を用いての遺伝子診断を予定している。

VLCAD 欠損症の同名変異例についても、酵素活性測定によって罹患と判定されていることで、スプライシング解析など追加実施する必要性を判断することができ、マンパワーの適切な配分に有用であった。

一方、CPT-2 欠損症については、新生児スクリーニング陽性基準を引き下げたことで、非罹患患者と思われる新生児が 3 例も精査対象となった。全エクソンの直接塩基配列解析だけでは、変異が検出されなくても確実な除外診断とはならず、また隣接酵素であるカルニチン-アシルカルニチントランスロカーゼ (CACT) 欠損症の可能性も低頻度ながら残されるため、いったん精査対象としてしまうと、児の家族を診断未確定の不安な状況に長期間晒すという事態が生じてしまう。

このように、除外診断には特に酵素活性測定の必要性が高く、タンデムマス新生児スクリーニングの全国的な実施へと進みつつある中、簡便な酵素診断法を用意しておくことが強く求められるところである。我々は現在、放射性同位体を用いない測定法の開発に取り組んでおり、反応産物を分離定量するための HPLC 分析条件を設定した。VLCAD 活性測定と同様の逆相 HPLC 法によって、palmitoylcarnitine + CoA → palmitoyl-CoA + carnitine の反応で生じる palmitoyl-CoA が保持時間約 6.7 分で検出される (図 3) CPT 活性の測定では、ミトコンドリア外膜表面にある CPT-1 と、

内膜に存在する CPT-2 の活性を分離することが必要であり、至適条件の検討を継続中である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagi M, Lee T, Awano H, Tsuji M, Tajima G, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Takeshima Y, Matsuo M: A patient with mitochondrial trifunctional protein deficiency due to the mutations in the HADHB gene showed recurrent myalgia since early childhood and was diagnosed in adolescence. *Mol Genet Metab* 104: 556-559, 2011.

2. 学会発表

- 1) 但馬剛, 佐倉伸夫, 畑郁江, 重松陽介: 脂肪酸酸化異常症の急性発症例から治療を考える. 第 38 回日本マス・スクリーニング学会, シンポジウム: タンデムマス・スクリーニングの技術と臨床. 福井市, 2011 年 10 月
- 2) 原圭一, 但馬剛, 佐倉伸夫: 本邦で発見された中鎖アシル CoA 脱水素酵素(MCAD)変異酵素の機能解析. 第 53 回日本先天代謝異常学会. 千葉市, 2011 年 11 月
- 3) 重松陽介, 畑郁江, 但馬剛, 金澤正樹: タンデムマス・スクリーニングでのカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2 欠損症診断の困難性と対応. 第 53 回日本先天代謝異常学会. 千葉市, 2011 年 11 月
- 4) 山本晶子, 大崎琢磨, 松本志郎, 中村公俊, 三渕浩, 重松陽介, 但馬剛, 遠藤文夫: 日齢 2 に心室細動で発症し救命することができたが, RSV 感染症をきっかけに突然死した VLCAD 欠損症の一例. 第 53 回日本先天代謝異常学会. 千葉市, 2011 年 11 月

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

表 1. 血中 C14:1-アシルカルニチン増加例の酵素診断・遺伝子診断：2010 年度までの実績

被験者	残存活性 (%)*	遺伝子解析結果	
新生児スクリーニング陽性	11.9	709T>C (C237R)	1532A>G (R511Q)
新生児スクリーニング陽性	11.2	779C>T (T258M)	997insT
新生児スクリーニング陽性	4.8	708delCT	1246G>A (A416T)
新生児スクリーニング陽性	6.3	852G>A (V284V)	1434G>A (M478I)
新生児スクリーニング陽性	3.8	1793A>G (H598R)	1808G>C (C603S)
新生児発症 (低血糖症, 心停止)	0.8	1332G>A (K444K) homo	
低血糖症, 骨格筋症状	5.1	(他施設で複合ヘテロ変異を同定済み)	
骨格筋症状	6.0	995insT	1639C>T (V547M)
骨格筋症状	9.1	520G>A (V174M)	1349G>A (R450H)
骨格筋症状	6.5	696C>G (P266A)	1153C>T (R385W)
骨格筋症状	感度以下	1332G>A (K444K)	1349G>A (R450H)
他の骨格筋型 4 例	6.2 ~ 24.2	未解析	
**新生児発症 (低血糖症, 心停止)	61.9	1076C>T (A359V) heterozygote	
**新生児発症 (低血糖症)	79.1	1076C>T (A359V) heterozygote	
低血糖症 13 例 + 他 3 例	46.9 ~ 141.4	解析実施 9 例には変異を検出せず	

* 残存活性は正常対照検体での平均活性値に対する百分率表示。

** 双胎例

表 2. 血中 C14:1-アシルカルニチン増加例の酵素診断・遺伝子診断：2011 年度の新規症例

被験者	残存活性 (%)*	遺伝子解析結果	
1y6m, M 急性胃腸炎 → ALTE	2.8	696C>G (P266A)	1153C>T (R385W)

* 残存活性は正常対照検体での平均活性値に対する百分率表示。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

表 3. CPT-2 欠損症疑い例の遺伝子診断：2010 年度までの実績

被験者	遺伝子解析結果	
7m, M 急性脳症 低ケトン性低血糖症, 高アンモニア血症	481C>T (R161W)	1148T>A (F383Y)
2y, F 骨格筋症状	647A>G (Q216R)	G551D (1652G>A)

表 4. CPT-2 欠損症疑い例の遺伝子診断：2011 年度の新規症例

被験者	被験者			遺伝子解析結果
	C16 (μM) (<6.3)	C18:1 (μM) (<3.0)	(C16 + C18:1)/C2 (<0.6)	
新生児濾紙血 スクリーニング陽性	9.67	3.92	0.46	変異を検出せず
新生児 スクリーニング陽性	5.18	1.93	0.84	変異を検出せず
新生児 スクリーニング陽性	3.12	1.51	0.94	変異を検出せず
15y, F 不随意運動, 意識障害, 横紋筋融解症				変異を検出せず

図 1. *ACADVL* 825G>A (V284V) 変異のスプライシング解析結果 (別ファイル)

図 2. *ACADVL* 1332G>A (K444K) 変異のスプライシング解析結果 (別ファイル)

図 3. CPT 活性測定のための HPLC クロマトグラム: 保持時間 6.7 分のピーク = 反応産物 palmitoyl-CoA (別ファイル)

〔III〕 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakamoto O, Ohura T, Murayama K, Ohtake A, Harashima H, Abukawa D, Takeyama J, Haginoya K, Miyabayashi S, Kure S	Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria by novel mutations in the SUCLG1 gene.	Pediatr Int	53(6)	921-925	2011
Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Nijima S, Okano E, Numabe H, Matsubara Y	HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome.	J Hum Genet	56(10)	707-15	2011
Akamizu T, Sakura N, Shigematsu Y, Tajima G, Ohtake A, Hosoda H, Iwakura S, Ariyasu H, Kangawa K	Analysis of plasma ghrelin in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and glutaric aciduria type II.	Eur J Endocrinol	166(2)	235-240	2012
菅沼広樹、鈴木光幸、吉川尚美、原 聡、染谷朋之介、李 翼、久田研、東海林宏道、村山圭、高柳正樹、大竹明、清水俊明	劇症肝不全として発症したミトコンドリアDNA枯渴症候群の新生児例.	日本小児科学会雑誌	115	1067-1072	2011
Tanigawa J, Kaneko K, Honda M, Harashima H, Murayama K, Wada T, Takano K, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Aida N, Ohtake A, Osaka H	Two Japanese patients with Leigh syndrome caused by novel SURF1 mutations.	Brain Dev	In press		2012
Yamamoto A, Nakamura K, Mitsubuchi H, Matsumoto S, Iwai M, Shigematsu Y, Tajima G, Tsumura M, Okada S, Endo F	VLCAD deficiency in a patient who recovered from VF, but died suddenly of an RSV infection.	Pediatr Int	In press		2012

研究成果の刊行に関する一覧表

Oda E, Tanaka T, Migita O, Kosuga M, Fukushi M, Okumiya T, Osawa M, Okuyama T.	Newborn screening for Pompe disease in Japan.	Mol Genet Metab	104	560-565	2011
Furujo M, Kubo T, Kosuga M, Okuyama T.	Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in two Japanese siblings with mucopolysaccharidosis type VI.	Mol Genet Metab	104	597-602	2011
Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N.	Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency: the time-course of blood and urinary acylcarnitine levels during initial L-carnitine supplementation.	Tohoku J Exp Med.	221(3)	191-5	2010
Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S	Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase capital I, Ukrainian (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan.	Brain Dev	32(5)	409-11	2010
Yagi M, Lee T, Awano H, Tsuji M, Tajima G, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Takeshima Y, Matsuo M.	A patient with mitochondrial trifunctional protein deficiency due to the mutations in the HADHB gene showed recurrent myalgia since early childhood and was diagnosed in adolescence.	Mol Genet Metab	104	556-9	2011
Mushimoto Y, Fukuda S, Hasegawa Y, Kobayashi H, Purevsuren J, Li H, Taketani T, Yamaguchi S	Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1.	Mol Genet Metab	102	343-8	2011
久保田一生, 深尾敏幸, 堀友博, 小林弘典, 船戸道徳, 長谷川有紀, 山口清次, 近藤直実	カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2 欠損症のろ紙血血清のアシルカルニチンプロファイルの経時的変化	日本小児科学会雑誌	115	956-60	2011

〔IV〕 研究成果の刊行物・別刷



Original Article

Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria due to novel mutations in the *SUCLG1* gene

Osamu Sakamoto,¹ Toshihiro Ohura,^{1,2} Kei Murayama,⁵ Akira Ohtake,⁶ Hiroko Harashima,⁶ Daiki Abukawa,³ Junji Takeyama,⁴ Kazuhiro Haginoya,¹ Shigeaki Miyabayashi¹ and Shigeo Kure¹

¹Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, ²Department of Pediatrics, Sendai City Hospital, ³Departments of ³General Pediatrics and ⁴Pathology, Miyagi Children's Hospital, Sendai, ⁵Department of Metabolism, Chiba Children's Hospital, Chiba and ⁶Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Saitama Medical University, Saitama, Japan

Abstract **Background:** Succinyl-coenzyme A ligase (SUCL) is a mitochondrial enzyme that catalyses the reversible conversion of succinyl-coenzyme A to succinate. SUCL consists of an α subunit, encoded by *SUCLG1*, and a β subunit, encoded by either *SUCLA2* or *SUCLG2*. Recently, mutations in *SUCLG1* or *SUCLA2* have been identified in patients with infantile lactic acidosis showing elevated urinary excretion of methylmalonate, mitochondrial respiratory chain (MRC) deficiency, and mitochondrial DNA depletion.

Methods: Case description of a Japanese female patient who manifested a neonatal-onset lactic acidosis with urinary excretion of methylmalonic acid. Enzymatic analyses (MRC enzyme assay and Western blotting) and direct sequencing analysis of *SUCLA2* and *SUCLG1* were performed.

Results: MRC enzyme assay and Western blotting showed that MRC complex I was deficient. *SUCLG1* mutation analysis showed that the patient was a compound heterozygote for disease-causing mutations (p.M14T and p.S200F).

Conclusion: For patients showing neonatal lactic acidosis and prolonged mild methylmalonic aciduria, MRC activities and mutations of *SUCLG1* or *SUCLA2* should be screened for.

Key words lactic acidosis, methylmalonic acid, mitochondrial respiratory chain, *SUCLA2*, *SUCLG1*.

Urinary excretion of methylmalonic acid is caused by a defect in the isomerization of L-methylmalonyl-coenzyme A to succinyl-coenzyme A. The reaction is catalyzed by L-methylmalonyl-coenzyme A mutase (MCM), an enzyme that requires adenosylcobalamin as a cofactor.¹ Methylmalonic acidemia/aciduria is mainly classified into two types: one resulting from a defect in the MCM apoenzyme and another resulting from a defect in the steps leading to adenosylcobalamin synthesis. In some cases, other causes of methylmalonic acidemia/aciduria have been reported. Recently, deficiency of the succinyl-coenzyme A ligase (SUCL) has been reported in cases of infantile lactic acidosis with mild urinary excretion of methylmalonic acid.²

Succinyl-coenzyme A ligase is a mitochondrial enzyme associated with the Krebs cycle, catalyzing the reversible conversion of succinyl-coenzyme A to succinate. The enzyme consists of two subunits. The substrate specificity for guanosine diphosphate (GDP) or adenosine diphosphate (ADP) is determined by the β subunit. The α subunit is encoded by the *SUCLG1* gene, whereas the β subunit is encoded by *SUCLA2* for the ADP-specific

subunit and by *SUCLG2* for the GDP-specific subunit. *SUCLG1* is ubiquitously expressed, but its expression is particularly high in the heart, brain, kidney, and liver. The *SUCLA2* protein is primarily present in the brain, skeletal muscle, and heart, and the *SUCLG2* protein is present in the liver and kidney. More than 20 cases of deficiency in the α subunit (mutation in *SUCLG1*) or ADP-forming β subunit (mutation in *SUCLA2*) have been reported.^{3–5} These patients have mitochondrial respiratory chain (MRC) deficiency, mitochondrial DNA (mtDNA) depletion, encephalomyopathy, and mild methylmalonic aciduria.^{6–9}

Here, we describe the case of a Japanese female patient who presented with neonatal-onset lactic acidosis with urinary excretion of methylmalonic acid. *SUCLG1* mutation analysis showed that the patient was a compound heterozygote for disease-causing mutations.

Case report

In 1993 a female infant was born at 38 weeks gestation (birthweight, 2640 g; birth length, 47.3 cm). Her Apgar scores were normal. On the day after birth, she developed problems. Her blood sugar was lower than 1.1 mmol/L, and hence, continuous glucose infusion was started. Mechanical ventilation and peritoneal dialysis were started when the infant was 2 days old because of cyanosis, severe metabolic acidosis (pH, 6.638, base excess,

Correspondence: Osamu Sakamoto, MD, PhD, Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan. Email: osakamoto-thk@umin.ac.jp

Received 15 December 2010; revised 23 April 2011; accepted 11 May 2011.

Table 1 Laboratory data

	2 days	4 days	4 months
WBC (μL)	46 500	19 400	
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4.50	4.59	
Hb (g/dL)	18.0	18.0	
Ht (%)	59.0	51.5	
Plt ($\times 10^3/\mu\text{L}$)		105	
Total bilirubin (mg/dL)		8.8	
γ -GTP (IU/L)		136	
AST (IU/L)	607	217	
ALT (IU/L)	125	128	
LDH (IU/L)	5400	3860	
CK (IU/L)		6370	
CK-MB (IU/L)		216	
Na (mBq/L)		140	
K (mBq/L)		3.0	
TP (mg/dL)		4.7	
BUN (mg/dL)	23	24	
Cr (mg/dL)		1.2	
pH	6.638	7.477	
HCO_3^- (mEq/L)		14.5	
Base excess	-26.8	-4.9	
NH_3 (mmol/L)	191	45	
Lactate (mmol/L)	11	8.1	
Pyruvate (mmol/L)		0.41	
BS (mg/dL)		101	
Urine (organic acids excretion)		High, lactate, pyruvate; Moderate, methylmalonate, methylcitrate; Slight, glutarate, fumarate, succinate, 3-methylglutaconate	
Acylcarnitine (dried blood spots)			increase in C3 and C4DC
Methylmalonic acid (serum)			13 $\mu\text{mol/L}$ (control, not detected MCM-deficient patients, 220–2900)
Methylmalonic acid (urine)			321 mmol/molCr (control, mean [SD], 2.0 [1.2])
^{14}C -propionate fixation (cultured fibroblasts)			8% of control

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BS, blood sugar; BUN, blood urea nitrogen; CK, creatine kinase; γ -GTP, γ -glutamyltransferase; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; LDH, lactate dehydrogenase; MCM, L-methylmalonyl-coenzyme A mutase; Plt, platelets; RBC, red blood cells; TP, total protein; WBC, white blood cells.

-26.8), lactic acidemia (11 mmol/L), and hyperammonemia (191 $\mu\text{mol/L}$; Table 1). She was transferred to Tohoku University Hospital at 4 days old.

Upon admission there was a swelling in the liver 4 cm below the costal margin. The lactate and pyruvate levels were 8.1 mmol/L and 0.41 mmol/L, respectively (L/P ratio, 20). Gas chromatography and mass spectrometry of urinary organic acid showed high levels of lactate and pyruvate excretion; moderate methylmalonate and methylcitrate excretion; and slight glutarate, fumarate, succinate, and 3-methylglutaconate excretion.

Acidosis improved on the following day, and mechanical ventilation and peritoneal dialysis were stopped. She developed prolonged hypotonia. At 1 month of age, auditory brainstem response was absent, and severe hearing impairment was noted. Head computed tomography showed diffuse atrophy. At 4 months of age, mild cardiac hypertrophy was seen on echocardiogram. The patient could not balance her head.

Lactic acidemia (4–9 mmol/L) with an elevated L/P ratio (20–25) and mild urinary excretion of methylmalonic acid persisted.

An acylcarnitine profile of dried blood spots showed an increase in C3 (propionylcarnitine) and C4DC (isomers of methylmalonyl carnitine and succinylcarnitine). The serum level of methylmalonic acid was 13 $\mu\text{mol/L}$ (control, not detected; MCM-deficient patients, 220–2900 $\mu\text{mol/L}$). The urinary levels of methylmalonic acid and methylcitrate were 321 mmol/molCr and 81.7 mmol/molCr, respectively (control, mean \pm SD, 2.0 \pm 1.2 mmol/molCr and 2.0 \pm 0.9 mmol/molCr, respectively). A ^{14}C -propionate fixation assay using cultured fibroblasts showed that propionate fixation in the patient was 8% of that in the control. Enzymatic analyses of the pyruvate dehydrogenase complex and pyruvate carboxylase were normal.

Histology of a liver biopsy specimen indicated moderate macrovesicular and microvesicular steatosis in the hepatic parenchyma. There was no active inflammation or fibrosis. On electron microscopy hepatocytes containing lipid droplets were seen. Mitochondrial abnormalities and other specific findings were not apparent morphologically. Muscle biopsy samples were stained with hematoxylin and eosin, reduced nicotinamide adenine

dinucleotide tetrazolium reductase, modified Gomori-Trichrome, succinate dehydrogenase, periodic acid–Schiff, and cytochrome oxidase. No particular abnormalities were noted in the muscle biopsy specimens.

At 6 months of age, the patient was discharged from hospital. She was able to follow objects with her eyes. Because of feeding difficulty, a naso-gastric tube was used. She developed a social smile at 13 months of age but did not have head control. At 20 months of age, she suddenly died at home. Autopsy was not performed.

Because her clinical course was similar to that of previously reported SUCL-deficient patients,^{3,4} we restarted diagnostic analysis using fibroblasts and biopsied muscle samples that had been stored for 16 years in liquid nitrogen.

Methods

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Expression levels of the MRC complex (Co) I, II, III, and IV proteins in cultured fibroblasts were assessed on Western blotting using blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) according to previously described methods.¹⁰ Immunostaining was performed using monoclonal antibodies specific for the 39 kDa subunit of Co I, 70 kDa subunit of Co II, core 1 subunit of Co III, and subunit 1 of Co IV (Invitrogen, Camarillo, CA, USA).

Determination of enzyme activities

Activities of MRC Co I, II, III, and IV were assayed.¹⁰ The activity of each complex was presented as a percentage of the mean value obtained from 20 controls. The percentages of Co I, II, III, and IV activities relative to that of citrate synthase (CS) as a mitochondrial enzyme marker or Co II activity were calculated. Deficiency of each complex is confirmed when either the CS ratio and/or the Co II ratio is <45% (fibroblasts) or 35% (muscle).

Quantitative polymerase chain reaction

The mtDNA was quantitatively estimated on real-time amplification of ND1 fragments in the mtDNA genome, as described previously.¹⁰ To determine the overall abundance of mtDNA, the real-time amplification result of ND1 was compared with that of exon 24 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene, as nuclear DNA (nDNA).

Direct sequencing of the *SUCLG1* and *SUCLA2* genes

Genomic DNA was extracted from cultured fibroblasts using a Sepa Gene Kit (Sanko Junyaku, Tokyo, Japan). All coding exons, including flanking introns, in *SUCLG1* and the *SUCLA2* genes were amplified using polymerase chain reaction (PCR). To facilitate cycle sequencing analysis, M13 universal and reverse primer sequences were attached to the 5' ends of sense primers and antisense primers, respectively. PCR products were directly sequenced using a Big Dye Primer Cycle Sequencing kit and an ABI 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The Ethics Committee of the Tohoku University School of Medicine approved the present study.

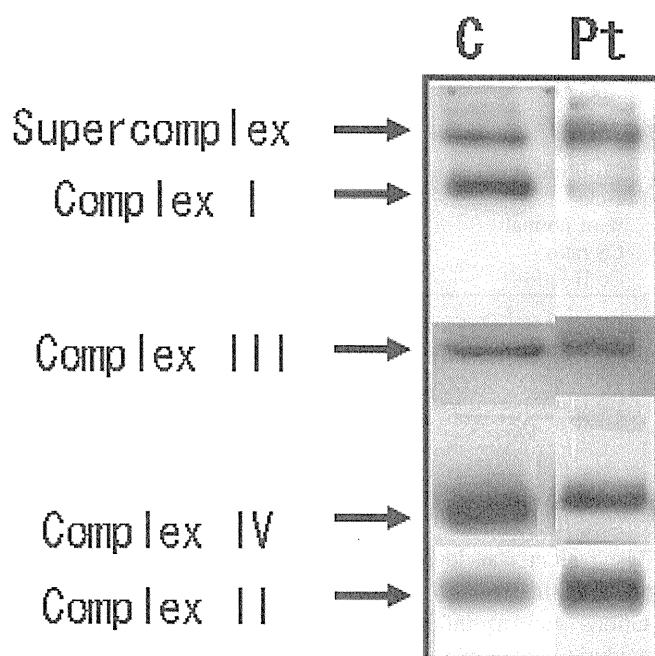


Fig. 1 Blue native polyacrylamide gel electrophoresis and subsequent Western blot analysis of mitochondrial respiratory chain complexes. The amount of assembled complex I was decreased. Complex I, anti-39 kDa subunit; complex II, anti-70 kDa subunit; complex III, anti-core 1 subunit; complex IV, anti-subunit 1.

Results

The amount of respiratory-chain complex in fibroblasts was determined on BN-PAGE Western blot. The intensity of the band corresponding to the assembled Co I of fibroblasts was decreased (Fig. 1). The intensity of the bands corresponding to Co II, III, and IV remained unchanged.

In fibroblasts, the enzyme activities of Co I and Co IV relative to that of Co II were decreased (<45%; Table 2). Even in the muscle biopsy samples, the ratios of (Co II + Co III)/CS, Co IV/CS, Co I/Co II, (Co II + Co III)/Co II, Co III/Co II, and CoIV/Co II were decreased.

Quantitative PCR showed that the ratio of mtDNA/nDNA of the fibroblasts did not decrease (72.9%; control, 76.4%). The ratio in the muscle biopsy specimen was also not decreased (270.1%).

Mutation analysis showed a heterozygous T-to-C substitution at position 41 in exon 1 of *SUCLG1* (c.41T > C; Fig. 2). This c.41T > C mutation changes the Met at position 14 to a Thr (p.M14T). Additionally, in exon 6, a heterozygous C-to-T substitution at position 599 in exon 1 of *SUCLG1* was found (c.599C > T). This mutation changes the Ser at position 200 to Phe (p.S200F). The p.M14T mutation was transmitted to the child from her mother; the other mutation (p.S200F) was transmitted to the child from her father (data not shown). Both substitutions were absent in the 100 alleles screened from healthy volunteers. No substitution was found in *SUCLA2*.

Table 2 Respiratory chain enzyme assay of the present patient

%	Co I	Co II	Co II + III	Co III	Co IV	CS
Fibroblasts						
% of normal	73	236	378	140	60	71
CS ratio	100	326	515	190	85	–
Co II ratio	30	–	158	58	26	–
Muscle						
% of normal	89	291	40	76	17	197
CS ratio	44	147	20	39	8	–
Co II ratio	30	–	13	26	6	–

Enzyme activities are expressed as % of mean normal control activity relative to protein, relative to CS, and relative to Co II. **Bold**, deficiency of the respective complex: <45% (fibroblasts) or 35% (muscle) of either CS ratio and/or Co II ratio. Reference range, fibroblasts 45–170; muscle 35–160.

Co I, complex I; Co II, complex II; Co III, complex III; Co IV, complex IV; CS, citrate synthase.

Discussion

The patient was identified to have a compound heterozygote mutation in *SUCLG1* (p.M14T and p.S200F). Clinical manifestations such as infantile lactic acidosis, mild methylmalonic aciduria, hypotonia, and hearing loss were compatible with symptoms previously reported in patients with *SUCLG1* or *SUCLA2* mutations.^{3,6} The p.M14T and p.S200F mutations have not been reported previously. These substitutions were not found in the 100 alleles from healthy volunteers. p.M14 is located within the mitochondrial targeting sequence. Van Hove *et al.*

reported a patient with a mutation at the same methionine (p.M14L) and speculated that the substitution of p.M14 would prevent proper translation initiation.¹¹ p.S200 is conserved across several species (Fig. 2). These data suggest that p.M14T and p.S200F are not polymorphisms but disease-causing mutations.

The amount of MRC complex I was decreased on BN-PAGE and Western blotting using fibroblasts, and multiple MRC defects were detected on enzyme assay. The ratios of mtDNA/nDNA of fibroblasts and muscle, however, did not decrease. Valayannopoulos *et al.* also reported that mtDNA depletion was not observed in two patients.⁶ It is suggested that not all *SUCL*-deficient

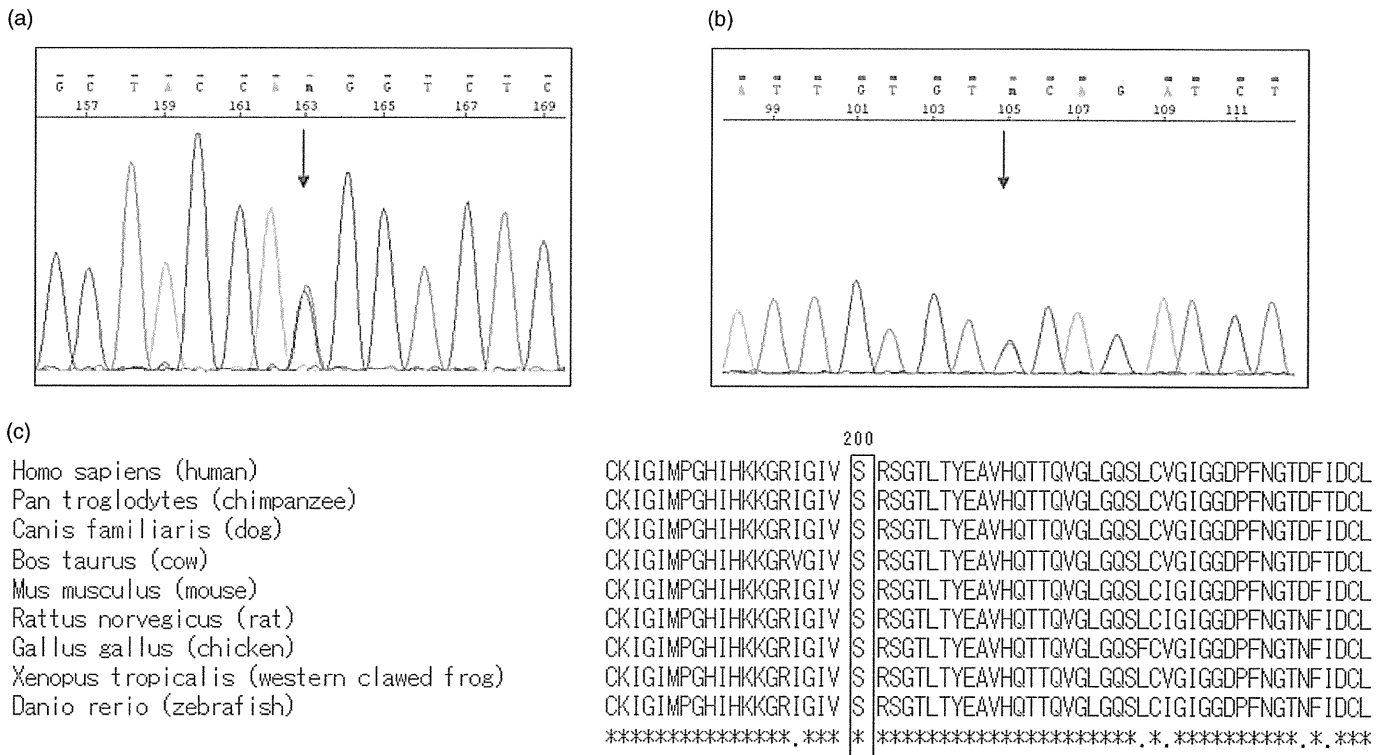


Fig. 2 (a) Heterozygous T-to-C substitution detected at c.41 in exon 1 of *SUCLG1*. This c.41T > C mutation changes the Met at position 14 to Thr (p.M14T). (b) Heterozygous C-to-T substitution detected at c.599 in exon 6 of *SUCLG1*. The c.599C > T substitution changes the Ser at position 200 to Phe (p.S200F). (c) Comparison of succinyl-coenzyme A ligase (SUCL) α subunits from several species. Serine at p.200 was conserved across all the species tested.