

レーベル病 (Leber's hereditary optic neuropathy) の DNA 診断

真島 行彦*, 小口 芳久*, 植村 恭夫*, 工藤 純**, 堺 弘介**, 清水 信義**

*慶應義塾大学医学部眼科学教室, **慶應義塾大学医学部分子生物学教室

要 約

黒人と白人, さらに日本人においてもレーベル病患者のミトコンドリア DNA において, 11778番目の塩基の点突然変異が報告されており, この部位は制限酵素 SfaNI の認識部位である. 今回, 臨床的に典型的なレーベル病とされる日本人男性患者と保因者である母のミトコンドリア DNA において, SfaNI による DNA 診断を施行した. ミトコンドリア DNA の11778番目の塩基を中心に255塩基対の DNA 断片を polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅した. 正常者のミトコンドリア DNA 断片は SfaNI により切断されたが, 患者と保因者のミトコンドリア DNA 断片は SfaNI により切断されず, SfaNI の認識配列内に突然変異が生じていた. SfaNI によるレーベル病の DNA 診断が欧米人とは遺伝的背景の異なる日本人においても有効で, さらにその保因者の同定も可能であることが示唆された. (日眼会誌 94 : 683-687, 1990)

キーワード: レーベル病, ミトコンドリア DNA, DNA 診断, SfaNI, PCR 法

DNA Diagnosis of Leber's Hereditary Optic Neuropathy

Yukihiko Mashima*, Yoshihisa Oguchi*, Yasuo Uemura*,
Jun Kudoh**, Kosuke Sakai** and Nobuyoshi Shimizu**

*Department of Ophthalmology, **Department of Molecular Biology
School of Medicine, Keio University

Abstract

The point mutation at nt11778 in mitochondrial DNA is highly associated with Leber's hereditary optic neuropathy and eliminates a restriction enzyme SfaNI site in American blacks and Caucasians. DNA diagnosis was applied to a male Japanese patient with this disorder and his mother as a carrier. The mitochondrial DNA fragments (255bp) including this mutation were amplified by polymerase chain reaction. SfaNI digested the DNA fragments of normal Japanese subjects, but did not digest those of the patient or the carrier. The mutation within the SfaNI site is also associated with Japanese suffering from this disorder. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94 : 683-687, 1990)

Key words: Leber's hereditary optic neuropathy, Mitochondrial DNA, DNA diagnosis, SfaNI, Polymerase chain reaction

別刷請求先: 160 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 小口 芳久

(平成元年8月16日受付, 平成元年12月11日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshihisa Oguchi, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Keio Univ.
35 Shinano-Machi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160, Japan

(Received August 16, 1989 and accepted in revised form December 11, 1989)

I 緒 言

レーベル病は両眼性に急激な視力障害をきたし、視神経萎縮にいたる重要な遺伝性の視神経疾患である。その本態は、乳頭周囲の拡張性微細血管症 (telangiectatic microangiopathy) による神経障害とされている¹⁾²⁾。遺伝に関しては、男性患者の子孫には発症しないことや、保因者の女性が産んだ娘はほとんど(100%といってもよい)が保因者となることで、従来のメンデル形式の遺伝はあてはまらず、細胞質遺伝が考えられていた³⁾。1980年にミトコンドリアは母性遺伝することが明らかとなり⁴⁾、レーベル病はミトコンドリアによる遺伝が考えられた⁵⁾。

また、以前よりレーベル病の発症に慢性的シアン中毒が重要な因子と考えられていたが⁶⁾⁷⁾、シアンの解毒に作用する thiosulfat-sulfur-thansferase の酵素活性の減少がレーベル病では報告されている⁸⁾。この酵素はミトコンドリアのマトリックスに存在するが、酸化リン酸化反応に関する NADH dehydrogenase を修飾することが報告されている⁹⁾。これらのことより、レーベル病はミトコンドリア異常の可能性が示唆されていた¹⁰⁾。最近、Wallace らのグループは¹¹⁾¹²⁾黒人および白人のレーベル病患者のミトコンドリア DNA (mtDNA) において、NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) 遺伝子に点突然変異を生じていることをつきとめ、さらに制限酵素 SfaNI により遺伝子診断ができることを報告した。日本人においても Yoneda ら¹³⁾も、同様の報告をしている。今回、臨床的に典型的なレーベル病とされる日本人の患者とその母親について同様の検索を行ったのでここに報告する。

II 対象および方法

今回の検索では、以前に報告した28歳の男性患者と

保因者であるその母を対象とした(図1)²⁾¹⁴⁾。正常人の対照として、日本人の男性と韓国人の女性を用いた。

1) ミトコンドリア DNA の抽出 (Hirt 法⁵⁾)

1. ヘパリン採血した血液5mlより白血球成分を分離、洗浄し、 -80°C で凍結保存した。

2. buffer (10mM Tris-HCl: pH 8.0, 10mM EDTA) に白血球を懸濁し、SDS (最終濃度0.5%) を加え攪拌後、NaCl (最終濃度1M) を入れゆっくりまぜ、水中に一晩おいた。

3. 14,000rpm にて30分間遠心し (4°C)、核 DNA (沈殿) とミトコンドリア DNA (上清) を分離した。上清をとり、SDS (最終濃度0.5%) を加え攪拌後、プロテイナーゼ K (最終濃度100mg/ml) を加え 50°C で1時間保温した。

4. 等量のフェノールで10分間混和後、15,000rpm で3分間遠心し、水層をとる。同様の操作を等量のフェノール:クロロホルム(1:1)、さらに等量のクロロホルムで繰り返し蛋白質を除いた。

5. 水層に2倍量の10%エタノール (-20°C で保存) を加え、 -70°C で30分間おいた。

6. 10,000rpm にて10分間遠心し (4°C)、DNA を沈殿させ、エタノールを除いた。もう一度70%エタノールを加え、10,000rpm にて5分間遠心し (4°C)、DNA を沈殿させエタノールを除いた。その後、真空乾燥した。TE buffer (10mM Tris-HCl: pH 7.5, 1mM EDTA) 60 μl に溶かし、RNase (1mg/ml) 1 μl を加え、混在する RNA を分解し、 -20°C で保存した。

2) Polymerase chain reaction 法 (PCR 法)¹⁶⁾ による DNA 増幅

1. プライマー合成

制限酵素 SfaNI が作用する部位を中心に255塩基対(上流に100塩基対、下流に155塩基対)の領域を増幅するために、2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを

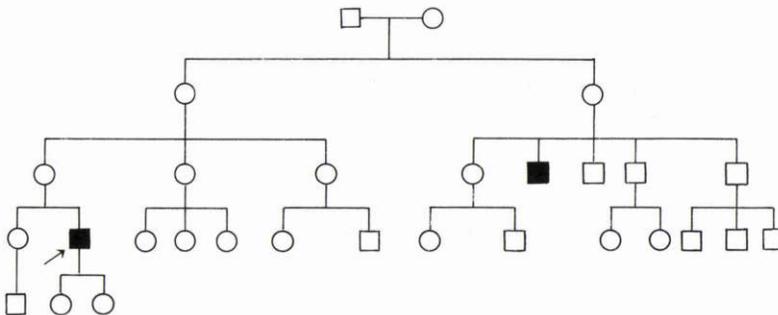


図1 レーベル病の家系図、男性患者(矢印)および母(保因者)より採血した。

合成した。プライマーの合成はDNA自動合成器 CYCLONE (Biosearch 社) にて行った。プライマーの塩基配列は、Anderson ら¹⁷⁾が決定した正常人のミトコンドリア DNA の塩基配列に基づいた。プライマー1は11690から11709でプライマー2は11944から11925とした。すなわち、プライマー1 (5'primer) は5'GGCGCAGTCATTCTCATAAT3', プライマー2 (3'primer) は5'AAGTAGGAGAGTGATATTTG3'である。

2. PCR法は、増幅装置としてDNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus 社) を用いて行った。以下のような反応液50 μ lを調製し、エッペンドルフチューブに入れる。増幅装置に入れる前に、反応中の蒸発を防ぐためにミネラルオイルを1滴入れる。反応液50 μ l中には、mtDNA 1 μ l, プライマー1および2各200ng, dNTPs各0.2mM, Tth DNA polymerase (Toyobo 社) 1単位, 10mM Tris-HCl (pH 8.9 at 25 $^{\circ}$ C), 1.5mM MgCl, 80mM KCl, 500 μ g/ml BSA, 0.1%コール酸ナトリウム, 0.1%Triton X-100を含む。

方法は、a. 94 $^{\circ}$ Cで4分間 (DNAの変性), b. 94 $^{\circ}$ Cで30秒間 (DNAの変性), c. 50 $^{\circ}$ Cで2分間 (アニーリング), d. 72 $^{\circ}$ Cで2分間 (DNA polymeraseによるDNA鎖の伸長)とし、b-dのサイクルを30回繰り返す。最後に、e. 72 $^{\circ}$ Cで7分間反応させ、終了とした。

3) 制限酵素 SfaNI による切断

SfaNIはGCATC (5/9)を認識し、切断する制限酵素である。PCR法にて増幅した4検体のDNAのうち、1 μ lに制限酵素反応液および0.23単位のSfaNI (New England Biolabs 社)を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (50Vで90分)によりDNA断片を分離した後、臭化エチジウム染色を行い、紫外線ランプ照射下でポラロイド667フィルムを用いて撮影した。

III 結 果

4検体のすべてに、PCR法による255塩基対のND4遺伝子断片の増幅が認められた (図2)。図3において、正常者2名 (レーン1, 2)のDNA断片は制限酵

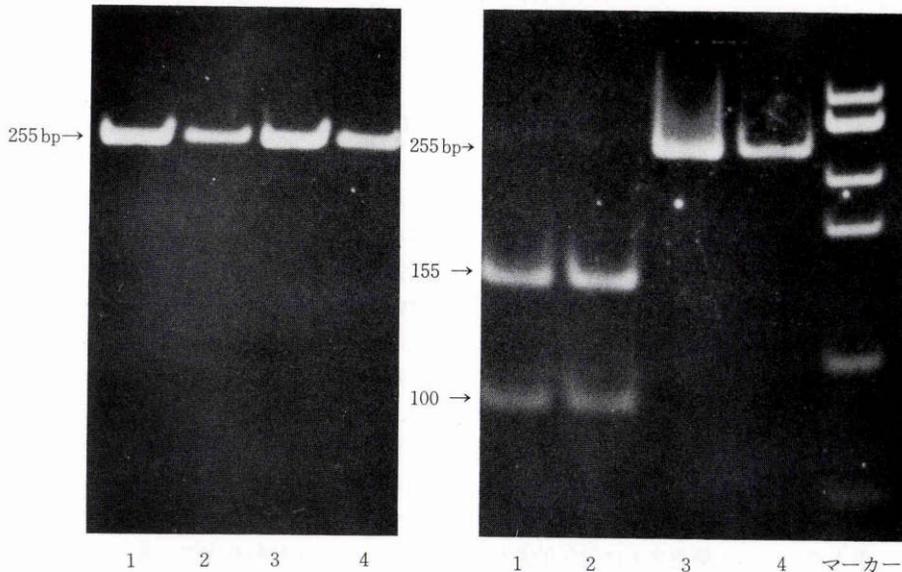


図 2

図 3

図2 PCR法により増幅したDNAのうち、各1 μ lを5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した、すべての検体で255bpのND4遺伝子断片の増幅が認められた。レーン1および2は正常者、レーン3はレーベル病の男性、レーン4はその母 (保因者)由来のmtDNAを用いた。

図3 255bpのDNA断片の制限酵素SfaNIによる反応、正常者2名 (レーン1, 2)のDNA断片は切断され、100bpと155bpの二本のバンドが認められた。レーベル病の男性 (レーン3)およびその母 (保因者) (レーン4)の255bpのDNA断片は切断されなかった。サイズマーカーとして ϕ X174 DNAのHae III断片を用いた。

- al: Fundus findings in Leber's hereditary optic neuroretinopathy. III. Fluorescein angiographic studies. *Arch Ophthalmol* 102: 981-989, 1984.
- 2) 真島行彦: Leber's optic neuropathy—蛍光眼底造影所見を中心に—. *眼科* 29: 135-144, 1987.
 - 3) 井街 謙: レーベル氏病. *日眼会誌* 77: 1658-1685, 1973.
 - 4) Giles RE, Blanc H, Cann HM, et al: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6715-6719, 1980.
 - 5) Egger J, Wilson J: Mitochondrial inheritance in a mitochondrially mediated disease. *N Engl J Med* 309: 142-146, 1983.
 - 6) Wilson J: Leber's hereditary optic atrophy: Some clinical and etioloigical considerations. *Brain* 86: 347-362, 1963.
 - 7) Wilson J: Leber's hereditary optic atrophy: A possible defect of cyanide metabolism. *Clin Sci* 29: 505-515, 1965.
 - 8) Cagianut B, Schnebli HP, Rhyner K, et al: Thiosulfat-sulfur-transferase Mangel bei Lebers hereditärer Optikusatrophie. *Klin Mbl Augenheilk* 181: 32-35, 1982.
 - 9) Pagani S, Galante YM: Interaction of Rhodanese with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochem Biophys Acta* 742: 278-284, 1983.
 - 10) Nikoskelainen E: New aspects of the genetic, etiologic, and clinical puzzle of Leber's disease. *Neurology* 34: 1482-1484, 1984.
 - 11) Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427-1430, 1988.
 - 12) Singh G, Lott MT, Wallace DC: A mitochondrial DNA mutation as a cause of Leber's hereditary optic neuropathy. *N Eng J Med* 320: 1300-1305, 1989.
 - 13) Yoneda M, Tsuji S, Yamaguchi T, et al: Mitochondrial DNA mutation in family with Leber's hereditary optic neuropathy. *The Lancet*, 8646(i): 1076-1077, 1989.
 - 14) 真島行彦, 氣賀沢一輝, 小口芳久, 他: Leber's optic neuropathy—電気生理学的検討—. *眼紀* 38: 1046-1053, 1987.
 - 15) Wallace DC: Mitotic segregation of mitochondrial DNAs in human cell hybrids and expression of chloramphenicol resistance. *Somatic Cell Mol Genet* 12: 41-49, 1986.
 - 16) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.
 - 17) Anderson S, Bankier AT, Barrell, BG, et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465, 1981.
 - 18) Parker WD, Oley CA, Parke JK: A defect in mitochondrial electron-transport activity (NADH-Coenzyme Q oxidoreductase) in Leber's hereditary optic neuropathy. *N Eng J Med* 320: 1331-1333, 1989.
 - 19) Novotny EJ, Singh G, Wallace DC, et al: Leber's disease and dystonia: A mitochondrial disease. *Neurology* 36: 1053-1060, 1986.
-