

## 遺伝子増幅法を用いた Kearns-Sayre 症候群における 血小板ミトコンドリア DNA 欠失の分析

太田 由枝\*, 粟屋 忍\*, 田中 雅嗣\*\*, 佐藤 弥\*\*

大野 欽司\*\*, 山本 智子\*\*, 小澤 高将\*\*, 太田 一郎\*\*\*

\*名古屋大学医学部眼科学教室, \*\*名古屋大学医学部第2生化学教室, \*\*\*公立陶生病院眼科

### 要 約

Kearns-Sayre 症候群の遺伝子診断のためミトコンドリア DNA (mtDNA) の欠失の検出が骨格筋を試料として Southern blot 法によって行われてきた。今回、骨格筋に比して容易に採取しうる血小板を試料として、polymerase chain reaction (PCR 法) により mtDNA の欠失の有無を検討した。4 症例中 3 症例で短い異常 DNA 断片が増幅され、欠失をもった mtDNA が存在することが示された。欠失の大きさは 8.3kb, 7.2kb, および 4.7kb であった。また PCR 再増幅法により欠失の位置を調べ、症例 1 の欠失は CO1 遺伝子と *cyt b* 遺伝子の間に、症例 2 の欠失は CO1 遺伝子と ND5 遺伝子の間に、症例 3 の欠失は ATPase6 あるいは CO3 遺伝子と ND5 遺伝子の間にあった。コントロールおよび患者の母親の mtDNA では、患者と同じ条件では異常断片は増幅されなかった。本症候群の mtDNA の異常は末梢血にも存在し、血小板による遺伝子診断が可能であることが示された。(日眼会誌 95:776-782, 1991)

キーワード：ミトコンドリアミオパチー, Kearns-Sayre 症候群, ミトコンドリア DNA, 血小板, Polymerase chain reaction (PCR) 法

## Detection of Deletions in Platelet Mitochondrial DNA in Kearns-Sayre Syndrome Using Polymerase Chain Reaction

Yoshie Ota\*, Shinobu Awaya\*, Masashi Tanaka\*\*, Wataru Sato\*\*,  
Kinji Ohno\*\*, Tomoko Yamamoto\*\*, Takayuki Ozawa\*\* and Ichiro Ota\*\*\*

\*Department of Ophthalmology, Nagoya University School of Medicine

\*\*Department of Biomedical Chemistry, Nagoya University School of Medicine

\*\*\*Eye Clinic, Tohsei General Hospital

### Abstract

Kearns-Sayre syndrome has been genetically diagnosed by detecting deleted mitochondrial DNA in muscle biopsy specimen using the Southern blot method. However, deleted mitochondrial DNA cannot be detected in the blood by this method. With the limited availability of muscle biopsy specimens in mind, we attempted to establish a noninvasive genetic diagnostic method for this syndrome. The polymerase chain reaction (PCR) was employed for detecting mitochondrial DNA deletions in platelets at levels below the sensitivity of Southern blotting. We selected several pairs of

別刷請求先：466 名古屋市昭和区鶴舞町65 名古屋大学医学部眼科学教室 太田 由枝  
(平成2年10月5日受付, 平成2年11月15日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshie Ota, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya University School of Medicine,  
65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466, Japan

(Received October 5, 1990 and accepted in revised form November 15, 1990)

oligonucleotide primers, considering the regions of predilection for deletion in this syndrome, and identified mitochondrial DNA deletions in platelets in three of four patients. The size and the locations of the deletions were determined by the nesting primer PCR method, in which the primary PCR products derived from deleted mitochondrial DNAs were subjected for reamplification using a series of nesting primers. By this method, it was possible to determine whether the products retained a complementary site for each primer. Patient 1 had an 8.3-kb deletion starting within the CO1 gene and ending within the Cyt *b* gene. Patient 2 had a 7.2-kb deletion starting within the CO1 gene and ending within the ND5 gene. Patient 3 had a 4.7-kb deletion starting within the ATPase6 or the CO3 gene and ending within the ND5 gene. Deletions were detected neither in Patient 4 nor in three mothers of four patients. These results indicate that the present method is useful for noninvasive genetic diagnosis of Kearns-Sayre syndrome. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95 : 776-782, 1991)

**Key words :** Mitochondrial myopathy, Kearns-Sayre syndrome, Mitochondrial DNA, Platelet, Polymerase chain reaction

## I 緒 言

ミトコンドリアは固有のDNAを有しているという特異な細胞内小器官である。ヒトのミトコンドリアDNA (mtDNA) は16,569塩基対の環状二重鎖DNAで、2種のリボゾームRNA, 22種のトランスファーRNA, 電子伝達系酵素複合体のサブユニット11種, ATP合成酵素のサブユニット2種をコードしている<sup>1)2)</sup>。Kearns-Sayre症候群<sup>3)4)</sup>(KSS)はミトコンドリアの形態異常, いわゆるragged-red fibersを伴うミオパチー(ミトコンドリアミオパチー<sup>5)</sup>)の一型と考えられている。近年, 本疾患でmtDNAの欠失が報告されている<sup>6)~10)</sup>。本症におけるmtDNAの欠失の検出には主に生検骨格筋を試料としたSouthern blot分析が用いられてきた。今回, 我々は本症候群の遺伝子診断のために4症例の血小板を試料として, polymerase chain reaction (PCR)法によってmtDNAの欠失の有無とその欠失領域の決定を試みた。またmtDNAは母系遺伝することが知られている<sup>11)</sup>ため, 4症例中3症例の母親の血小板についても欠失DNAの検出を試みた。

## II 症例と方法

### 1. 症例

症例1は17歳女性。3歳で低身長を指摘され, 10歳より眼瞼下垂・眼球運動制限が始まり, 針生検でragged-red fibersが検出された。14歳からインスリン依存性糖尿病の治療が開始され, 網脈絡膜変性・視野狭窄・感音性難聴を併発した。症例2は40歳女性。3歳より眼瞼下垂・眼球運動制限を認め, 網脈絡膜変性,

感音性難聴を併発した。その娘にも難聴がある。針生検でragged-red fiberが検出されている。症例3は30歳女性。19歳より眼瞼下垂・眼球運動制限, 20歳で筋力低下・夜盲を認め, 針生検でragged-red fibersが検出され, 網脈絡膜変性も指摘された。25歳で完全房室ブロック, 26歳より振顫・運動失調を認めた。症例4は19歳男性。8歳で低身長を指摘され, 11歳で視力低下および網脈絡膜変性, 13歳より眼瞼下垂・眼球運動制限・筋力低下・運動失調が出現, 針生検でragged-red fibersが検出された。15歳で完全右脚ブロック, 16歳より感音性難聴, 18歳よりインスリン依存性糖尿病を指摘された。これらの症例の眼底所見およびその分類については既に報告した<sup>12)</sup>。

### 2. 血小板の分離

患者, 母親, 正常人より10~20mlの血液をヘパリン採血し, 室温で終濃度4.6mMのEDTAを加えた後, 1,400×g, 3分間遠心分離した。その上清をさらに2,250×g, 15分間遠心分離し, 沈渣を10mlの洗浄緩衝液(4.3mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 113mM NaCl, 4.4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5mM glucose, pH 6.5)に懸濁させた。それを120×g 7分間遠心分離後, 上清を2,000×g 15分間遠心分離, その沈渣を1mlの緩衝液(4.3mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 16mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 109mM NaCl, 8.3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5mM glucose, pH 6.5)に懸濁させた。

### 3. DNAの調製

血小板浮遊液100μlを100μg/ml proteinase K, 0.5%SDSを含む400μlのBCL緩衝液(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.32M sucrose, 1% Triton X-100)で37°C10分間処理した後, フェノール/

表1 遺伝子増幅に用いた合成プライマー

プライマー	塩基配列 (5'→3')	相補部位*
L4	CTCCATGCATTTGGTATTTT	41 to 60
L288	CTACTATACTCAATTGATCC	2,881 to 2,900
L568	CAAACACTTAGTTAACAGCT	5,681 to 5,700
L596	CTATTATTCGGCGCATGAGC	5,961 to 5,980
L625	TATAGTGGAGGCCGGAGCAG	6,251 to 6,270
L790	TGAACCTACGAGTACACCGA	7,901 to 7,920
L820	TTCATGCCCATCGTCTAGA	8,201 to 8,220
L853	ACGAAAATCTGTTCGCTTCA	8,531 to 8,550
L881	CACCAACTATCTATAAACCC	8,811 to 8,830
L909	ACACTTATCATCTTCAACAAT	9,091 to 9,110
L929	TCCGGCCTAGCCATGTGATT	9,291 to 9,310
H60	AAACATTTTCAGTGATTGTC	620 to 601
H318	AATACTAAGTTGAGATGATA	3,200 to 3,181
H674	ATAAACCTAGGAAGCCAAT	6,760 to 6,741
H902	GCATGAGTAGGTGGCCTGCA	9,040 to 9,021
H1338	TCTTGTTCATTTGTTAAGGTT	13,400 to 13,381
H1363	GGGGAAGCGAGGTTGACCTG	13,650 to 13,631
H1393	GGGATTGTGCGGTGTGTGA	13,950 to 13,931
H1420	TTAGTAGTAGTTACTGGTTG	14,220 to 14,201
H1450	GGTTTAAATAGTTTTTTAAT	14,520 to 14,501
H1479	GGAGGTCGATGAATGAGTGG	14,810 to 14,791
H1506	TTTCTGAGTAGAGAAATGAT	15,081 to 15,061
H1534	GATCCCGTTTCGCAAGAA	15,360 to 15,341

\*ミトコンドリア DNA の塩基番号は Anderson et al. (1) による。

クロロホルム/イソアミルアルコール (25:25:1) で2回、クロロホルム/イソアミルアルコール (25:1) で1回抽出した。

#### 4. PCR の条件

DNA 溶液5 $\mu$ l を200 $\mu$ M の各デオキシヌクレオシド3リン酸, 1 $\mu$ M の各プライマー, (表1) 1.25単位の *Taq* ポリメラーゼ (*AmpliTaq*, Perkin-Elmer/Cetus), PCR 緩衝液 (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%ゼラチン) を含む50 $\mu$ l の反応液中で増幅した。増幅反応は Thermal Cycler (Perkin-Elmer/Cetus) を使い, 94 $^{\circ}$ C 15秒, 72 $^{\circ}$ C 60秒, 45 $^{\circ}$ C 15秒で35サイクル行った。PCR に用いたプライマーは, 島津製作所 NS-IDNA シンセサイザーあるいは Applied Biosystems 380B DNA シンセサイザーで合成し, Applied Biosystems の Oligonucleotide Purification Cartridge で精製した。

#### 5. DNA 再増幅法

初回 PCR 増幅産物5 $\mu$ l を上記の初回 PCR と同じ条件で再増幅を行った。プライマーの組み合わせは表2に示した。

#### 6. PCR 増幅産物の電気泳動

PCR 増幅産物各10 $\mu$ l に色素液 (50%グリセロール, 3%プロモフェノールブルー) 2 $\mu$ l を混合, TEA 緩衝

液 (40mM トリス酢酸, 1mM EDTA, pH 7.6) で作成した1%アガロースゲルにて TEA 緩衝液中で100Vにて2時間泳動後, 0.5 $\mu$ g/ml エチジウムブロマイドで染色し, 紫外線照射により DNA のバンドを検出した。マーカーには *Hind* III 切断の  $\lambda$  ファージ DNA, *Hae* III 切断の  $\phi$ x174DNA の混合したものをを用いた。

### III 結 果

これまで報告されたミトコンドリアミオパチーの mtDNA 欠失では, すべての例で D-ループ領域は保存されていた<sup>6)~10)</sup>。そこで, プライマー-L4 と H60 を用いてこの領域の増幅を行い, mtDNA の増幅が有効に行われているかどうかの確認とした。その結果, 今回用いたすべての患者, 母親, 正常人で0.58kb の長さの単一のバンドが増幅され, 上記の条件で mtDNA が有効に抽出, 増幅できることが確認された。次に各症例の血小板 DNA を表2に示した種々のプライマー対で増幅した。約0.3kb ごとにすべての mtDNA ゲノムを網羅する123個のプライマーを合成し, 正常コントロールで異常断片が増幅されないことを確認した上で, 表2にあげたプライマー対を用いた。症例1では, 9.6kb 離れた L568 と H1534 のプライマー対を用いて増幅したとき, 1.3kb の断片が増幅された(図1, レーン1)。これは8.3kb の欠失の存在を示している(表3)。患者の母親および正常人の血小板 mtDNA では同じプライマー対を用いても異常断片は増幅されなかった(図1, レーン2, 3)。症例2では8.2kb 離れた L596 と H1420 のプライマー対を用いて増幅した時, 1.0kb の断片が得られ(図1, レーン4), 7.2kb の欠失の存在

表2 欠失したミトコンドリア DNA を検出するために用いたプライマー対

プライマー対	プライマー間の距離 (kb)
L4 +H318	3.14
L4 +H674	6.74
L288+H902	6.14
L568+H1534	9.66
L596+H1363	7.67
L596+H1420	8.24
L596+H1534	9.38
L596+H1619	10.23
L790+H1420	6.3
L790+H1619	8.29
L820+H1363	5.43

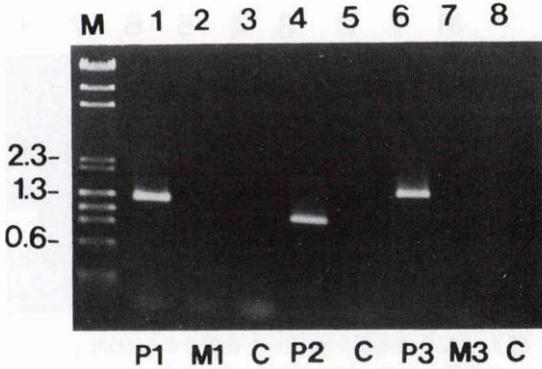


図 1 ~ 4 において上に M と示した最も左のレーンはマーカーである。

図 1 症例 1, 2, 3, 症例 1, 3 の母親, および正常人の血小板ミトコンドリア DNA (mtDNA) の欠失の分析。各プライマー対を用い polymerase chain reaction (PCR) 法でそれぞれの血小板 mtDNA を増幅した。レーン 1 (P1): 症例 1, レーン 2 (M1): 症例 1 の母親, レーン 3 (C): 正常人, レーン 1 ~ 3 ではプライマー-L568 と H1534 を用いた。レーン 4 (P2): 症例 2, レーン 5 (C): 正常人, レーン 4, 5 ではプライマー-L596 と H1420 を用いた。レーン 6 (P3): 症例 3, レーン 7 (M3): 症例 3 の母親, レーン 8 (C): 正常人, レーン 6 ~ 8 ではプライマー-L790 と H1420 を用いた。母親と正常人の mtDNA では増幅断片がみられない(レーン 2, 3, 5, 7) のに対し, 症例 1, 2, 3 (レーン 1, 4, 6) の mtDNA では異常断片が増幅されている。

表 3 症例 1-3 において増幅された異常断片の大きさ及びそれらから推定される欠失の大きさ

プライマー対	プライマー間の距離 (kb)	増幅された断片の大きさ (kb)	欠失の大きさ (kb)
症例 1			
初回増幅			
L568+H1534	9.6	1.3	8.3
再増幅			
L596+H1534	9.3	1.0	8.3
L625+H1534	9.1	—	—
L596+H1506	9.1	0.8	8.3
L596+H1479	8.8	0.5	8.3
L596+H1450	8.5	—	—
症例 2			
初回増幅			
L596+H1420	8.2	1.0	7.2
再増幅			
L625+H1420	7.9	—	—
L596+H1393	8.0	0.8	7.2
L596+H1363	7.7	0.5	7.2
L596+H1338	7.4	—	—
症例 3			
初回増幅			
L790+H1420	6.3	1.6	4.7
再増幅			
L820+H1420	6.0	1.3	4.7
L853+H1420	5.7	1.0	4.7
L881+H1420	5.4	0.7	4.7
L909+H1420	5.1	0.4	4.7
L929+H1420	4.9	—	—
L790+H1393	6.0	1.3	4.7
L790+H1363	5.7	—	—

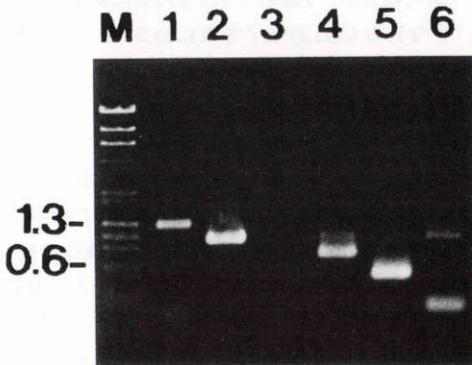


図 2 PCR 再増幅法を用いた症例 1 の mtDNA 欠失の位置の分析。初回 PCR の産物を次のプライマー対で再増幅した。レーン 1: プライマー-L568 と H1534 を用いた初回 PCR 産物。レーン 2: L596 と H1534 を用いた再増幅。レーン 3: L625 と H1534 を用いた再増幅。レーン 4: L596 と H1506 を用いた再増幅。レーン 5: L596 と H1479 を用いた再増幅。レーン 6: L596 と H1450 を用いた再増幅。

を示す(表 3)。正常人の血小板 mtDNA では同じプライマー対を用いても異常断片は増幅されなかった(図 1, レーン 5)。症例 3 では 6.3kb 離れた L790 と H1420 のプライマー対を用い、1.6kb の断片が増幅され(図 1, レーン 6)、4.7kb の欠失の存在を示す(表 3)。患者の母親および正常人の血小板 mtDNA では同じプライマー対を用いても異常断片は増幅されなかった(図 1, レーン 7, 8)。症例 4 とその母親では表 2 に示したプライマー対を用いて増幅を試みたが、異常断片は見られなかった。初回 PCR で得られた断片が欠失 mtDNA に由来するものであることを確認し、欠失の位置を知るために PCR 再増幅法を行った。これは、プライマーに対応する部位が保存されているかどうかにより欠失の位置を決定する方法である。症例 1 では初回 PCR で L568 と H1534 のプライマー対を用いて得られた 1.3kb の断片を用いて再増幅を行った(図

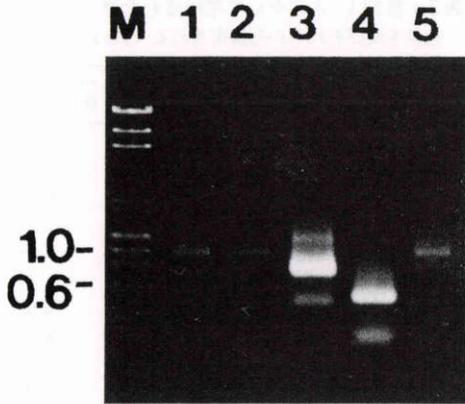


図3 PCR再増幅法を用いた症例2のmtDNA欠失の位置の分析. 初回PCRの産物を次のプライマー対で再増幅した. レーン1: L596, H1420を用いた初回PCR. レーン2: L625とH1420を用いた再増幅. レーン3: L596とH1393を用いた再増幅. レーン4: L596とH1363を用いた再増幅. レーン5: L596, H1393を用いた再増幅.

2). プライマー-L596とH1534を用いると1.0kbの断片が得られ(図2, レーン2), 8.3kbの欠失が確認できた(表3)と同時に, 欠失mtDNAがL596に対応する部位を保存していることが示された. しかしL625とH1534を用いると, 初回のパンド以外にははっきりしたパンドが見られず(図2, レーン3), 欠失mtDNAがL625には対応する部位をもたないと考えられ, このmtDNAの欠失はプライマー-L596とL625の間の位置, すなわち塩基番号5961と6251(表1)の間に始まることわかった. 欠失の終りの位置を知るためL596とH1506, H1479あるいはH1450を用いて再増幅を行った. その結果プライマー-H1506, H1479ではそれぞれ0.8kb, 0.5kbの断片が得られ(図2, レーン4, 5), これらによっても8.3kbの欠失を確認した(表3)が, プライマー-L596とH1450でははっきりした断片は得られなかった(図2, レーン6). よって, 欠失の終わりはH1450とH1479の位置の間, すなわち塩基番号14501と14791の間にあると考えられた. これらの結果より, 症例1のmtDNAの欠失の大きさは8.3kbでCOI遺伝子領域に始まり, Cyt b遺伝子領域に終わっていることが示された.

症例2では初回PCRにおいてL596とH1420のプライマー対を用いて得られた1.0kbの断片を用いて再増幅を行った(図3). プライマー-L625とH1420を用いると, 初回のパンド以外にははっきりしたパンドが見

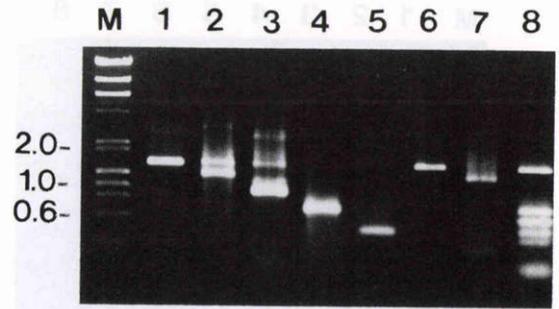


図4 PCR再増幅法を用いた症例3のmtDNA欠失の位置の分析. 初回PCRの産物を次のプライマー対で再増幅した. レーン1: L790とH1420を用いた初回PCR産物. レーン2: L820とH1420を用いた再増幅. レーン3: L853とH1420を用いた再増幅. レーン4: L881とH1420を用いた再増幅. レーン5: L909とH1420を用いた再増幅. レーン6: L929とH1420を用いた再増幅. レーン7: L790とH1393を用いた再増幅. レーン8: L790とH1363を用いた再増幅.

られなかった(図3, レーン2). またプライマー-L596とともにH1393, H1363, H1338を用いると, H1393, H1363を用いた場合にはそれぞれ0.9kb, 0.5kbの断片が得られ(図3, レーン3, 4)るが, L596と共にH1338を用いると, 初回のパンド以外にははっきりした断片は得られなかった(図3, レーン5). 以上より, 症例2のmtDNAの欠失の大きさは7.2kbで, 塩基番号5961と6251の間に始まり, 13381と13631の間に終わっていること, すなわちCOI遺伝子領域に始まり, ND5遺伝子領域に終わっていることが示された.

症例3では初回PCRにおいてL790とH1420のプライマー対を用いて得られた1.6kbの断片を用いて再増幅を行った(図4). H1420とL820, L853, L881, L909, L929を用いると, L820, L853, L881およびL909ではそれぞれ1.3kb, 1.0kb, 0.7kb, 0.4kbの断片が得られた(図4, レーン2, 3, 4, 5)が, L929では初回のパンド以外にははっきりした断片は見られなかった(図4, レーン6). またL790とH1393, H1363を用いると, H1393のときは1.3kbの断片が得られた(図4, レーン7)が, H1363を用いると, はっきりした断片は得られなかった(図3, レーン8). 再増幅によって得られた断片はすべて4.7kbの欠失の存在を示した(表3). 以上より, この症例のmtDNAの欠失の大きさは4.7kbで, 塩基番号9091と9291の間に始まり, 13631と13931の間に終わっていること, すなわち

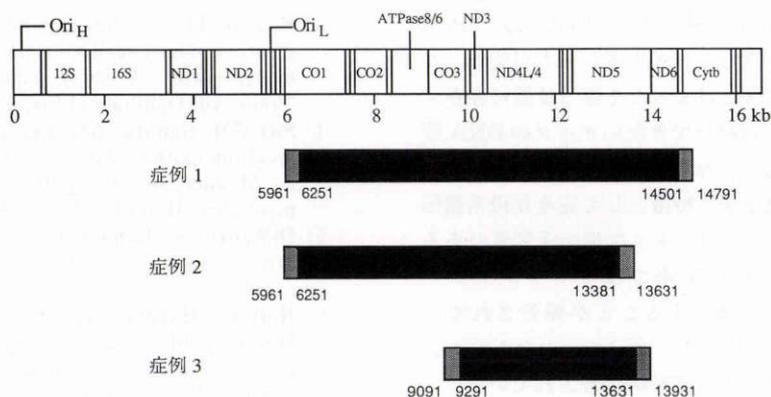


図 5 mtDNA の遺伝子地図と 3 症例において検出された mtDNA の欠失、上に示した mtDNA 遺伝子地図において ND1 から ND6 は NADH-coenzyme Q oxidoreductase, CO1 から CO3 はチトクローム C オキシダーゼ, Cyt *b* はチトクローム *b*, ATPase 8/6 は ATP 合成酵素の各サブユニットの遺伝子を示す, また, 12S, 16S はリボソーム RNA を示す, Ori<sub>L</sub>, Ori<sub>H</sub> は L-鎖, H-鎖の複製開始部位を示す, 各症例において黒塗りの部分は欠失を示し, 欠失の前後に示した数は PCR 再増幅法で欠失の位置を決定した際に用いたプライマーの先端が結合した位置を示す。

ATPase 6 遺伝子領域或いは CO3 遺伝子領域に始まり, ND5 遺伝子領域に終わっていることが示された。

なお今回用いた血小板 DNA を用いたサザンプロット (分析制限酵素 *Pvu* II 切断による) では欠失ミトコンドリア DNA は検出されなかった。

#### IV 考 按

本症候群の患者ではさまざまな臓器に mtDNA の欠失があると報告されており, 6 種の臓器においてサザンプロット分析を行い, 同一の 4977bp の欠失が検出された例も報告されている<sup>13)</sup>が, その例では欠失を持つ DNA の正常 DNA に対する比は臓器ごとに異なり, 骨格筋で最も高く, 血液細胞はほとんど検出されず, 培養線維芽細胞, 培養筋細胞でも低かった。おそらくミトコンドリア遺伝子変異は, 細胞分裂の活発な組織では淘汰されやすく, そうでない組織では蓄積しやすいと考えられる。しかし今回の結果より, PCR 法を用いれば血液細胞でも mtDNA の欠失が検出できることが示された。

今回我々は, 初回の増幅で欠失の検出された症例について再増幅を行った。この再増幅により 2 つの重要な情報を得ることができる。ひとつは初回の増幅で得られた結果が欠失に由来することの確認である。PCR 法はときにプライマーが意図しなかった部位に結合

し, 異常断片が増幅されることが知られており, 再増幅によりプライマーの位置を移動させた分だけ得られた断片の長さが変化するかどうかにより, その可能性を除外できる。もうひとつの情報は欠失の位置である。今回は, 300bp の精度で決定した。従来, 本症候群の患者で報告されてきたミトコンドリア DNA の欠失の特徴は, 欠失の大きさと位置が症例ごとに異なることである。またある程度好発部位はあり, 共通して保存されている部位が存在することもその特徴である<sup>6)~10)</sup>。図 5 に示すように, 我々が得た結果でも 3 症例の欠失は位置, 大きさともに異なっていた。ミトコンドリア DNA は H-鎖と L-鎖から成っている。それぞれの複製開始部位は図 5 に示した位置にあり, これまで報告されたミトコンドリアミオパチーでの変異ミトコンドリア DNA でも, また今回我々が報告した欠失においても, 両者の複製開始部位は保存されていた。このことは, こういった欠失をもったミトコンドリア DNA が自己複製能を有していることの根拠となると同時に, PCR 法を用いたスクリーニングを行う時のプライマー選択の参考にもすべきである。すなわち保存されている可能性の高い部位に対応するプライマーを選び, 欠失を探ることができる。

さて, 今回の研究のなかで症例 4 は重い臨床症状にも拘らず, 欠失は検出できなかった。その理由として, この症例では欠失 mtDNA を含む血小板の頻度が低

かった可能性,あるいは欠失をもつDNAの量がPCR法を用いても検出できないほど小さかった可能性,これまで報告された欠失とはまったく違う位置に存在する可能性,PCR法では検出できないタイプのDNA変異をもつ可能性が考えられる。

ミトコンドリア遺伝子の特徴として完全な母系遺伝が知られている<sup>11)</sup>。ミトコンドリア遺伝子変異のある疾患のうち, Leber病の家系ではミトコンドリアDNAの点変異が母系遺伝することが報告されている<sup>14)15)</sup>。またミトコンドリアミオパチーのひとつである進行性外眼筋麻痺でも一家系が報告されている<sup>16)</sup>。そのため今回我々は,患者の母親の末梢血についても患者と同様に調べたが,少なくとも患者と同じ欠失は検出されなかった。ミトコンドリアエネルギー産生系においてmtDNAにコードされ,ミトコンドリアのマトリックス内で合成されるサブユニットは,核の遺伝子によって規定されたサブユニットとともに複合体を形成し,電子伝達とそれに共役したATP合成において,重要な役割を演じている。ミトコンドリアDNAは,ヒストンが欠如していること,イントロンを持たず,遺伝情報が隙間なく濃密に書き込まれていること,修復機構が簡素であること,活発な酵素代謝の行われているミトコンドリア内に存在し,活性酵素に常に暴露されていることから,ミトコンドリア遺伝子の変異は高い頻度で生じるものと考えられる<sup>17)</sup>。その結果,ミトコンドリア遺伝子によってコードされたサブユニットの欠損が起こり,そのために複合体の分子集合が阻害され,酵素活性,エネルギー産生の低下をきたし,様々な細胞機能の障害がもたらされるものと考えられる。そういったミトコンドリア遺伝子の変異のうち欠失を検索するためには,従来は骨格筋の生検標本をサザンブロット法で分析していた。我々は採血で得た血小板をPCR法で分析したが,これは患者への侵襲はより少なく,またアイソトープを用いず迅速に行える診断方法として非常に有用であると考えられる。

#### 文 献

- 1) **Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al:** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465, 1981.
- 2) **Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MWJ, et al:** Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* 314: 592-597, 1985.
- 3) **Kearns TP:** External ophthalmoplegia, pigmentary degeneration of the retina, and cardiomyopathy: A newly recognized syndrome. *Trans Am Ophthalmol Soc* 63: 559-625, 1965.
- 4) **Shy GM, Gonatas NK, Perez M:** Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. I. Megaconial myopathy. II. Pleoconial myopathy. *Brain* 89: 133-158, 1966.
- 5) **DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, et al:** Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 17: 521-538, 1985.
- 6) **Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA:** Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717-719, 1988.
- 7) **Lestienne P, Ponsott G:** Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. *Lancet* 1: 885, 1988.
- 8) **Holt IJ, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, et al:** Deletions of muscle mitochondrial DNA. *Lancet* 1: 1462, 1988.
- 9) **Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, et al:** Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 38: 1339-1346, 1988.
- 10) **Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, et al:** Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320: 1293-1299, 1989.
- 11) **Giles RE, Blanc H, Cann HM, et al:** Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6715-6719, 1980.
- 12) 木田一郎, 三宅養三, 粟屋 忍: Kearns-Sayre 症候群における眼底と視機能—Stage 分類の試み—. *日眼会誌* 93: 329-338, 1989
- 13) **Shanske S, Moraes CT, Lombes A:** Widespread tissue distribution of mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 40: 24-28, 1990.
- 14) **Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al:** Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427-1430, 1988.
- 15) **Yoneda M, Tsuji S, Ozawa T, et al:** Mitochondrial DNA mutation in family with Leber's hereditary optic neuropathy. *Lancet* 1: 1076-1077, 1989.
- 16) **Ozawa T, Yoneda M, Tanaka M, et al:** Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family with mitochondrial myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 1240-1247, 1988.
- 17) **Vawter L, Brown WM:** Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* 234: 194-196, 1985.