

ミトコンドリア DNA 3460 変異を有する日本人 レーベル視神経症の分子生物学的解析

緋田 芳樹¹⁾, 真島 行彦¹⁾, 佐賀 正道¹⁾, 周 正喜²⁾
秋谷 忍²⁾, 工藤 純³⁾, 清水 信義³⁾, 小口 芳久¹⁾

¹⁾慶応義塾大学医学部眼科学教室, ²⁾産業医科大学眼科学教室

³⁾慶応義塾大学医学部分子生物学教室

要 約

11778 変異陰性のレーベル視神経症の 1 家系において, 19 歳男性の酵素複合体 I (NADH dehydrogenase, ND) のミトコンドリア遺伝子領域の全塩基配列を決定した結果, ND1 遺伝子領域の 3460 番塩基であるグアニンからアデニンへの点突然変異がみられた。一方, 60 人の正常日本人にはこの変異はみられなかった。さらに, この家系には, 酵素複合体 IV の 7444 番塩基の変異もみられた。この変異により翻訳終了コドンが変化し, さらにアミノ酸が 3 個多くなる。本症例の最終視力は右眼 0.02, 左眼 0.04 と不良であった。30 人の両眼性視神経萎

縮患者において 3460 変異をスクリーニングした結果, 14 歳男子の 1 例にヘテロプラスミーとして変異がみられ, 発症約 2 年半後に視力は右眼 1.2, 左眼 0.7 に回復した。7444 変異はみられなかった。2 例の最終視力結果の違いは, ミトコンドリアにおけるエネルギー産生能の障害の程度の差を反映していると考えられた。(日眼会誌 99:728-734, 1995)

キーワード: レーベル視神経症, ミトコンドリア DNA, 3460 変異, 7444 変異, 視力回復

Molecular Genetic Analysis of Leber's Hereditary Optic Neuropathy with the 3460 Mutation in Japanese Pedigrees

Yoshiki Hiida¹⁾, Yukihiko Mashima¹⁾, Masamichi Saga¹⁾,
Masaki Shuu²⁾, Shinobu Akiya²⁾, Jun Kudoh³⁾,
Nobuyoshi Shimizu³⁾ and Yoshihisa Oguchi¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, School of Medicine Keio University

²⁾Department of Ophthalmology, University of Occupational and Environmental Health, Japan

³⁾Department of Molecular Biology, School of Medicine Keio University

Abstract

We have identified a point mutation at nucleotide position 3460 in the ND1 gene of complex I in a Japanese pedigree with Leber's hereditary optic neuropathy by sequencing the ND genes in mitochondrial DNA. None of the 60 healthy Japanese had the 3460 mutation. The proband and his mother also had the 7444 mutation in the COI gene of complex IV and became nearly blind at age 19 with visual acuities of 0.02 OD and 0.04 OS. We screened 30 patients with bilateral optic atrophy for the 3460 mutation, and identified one male patient who had the 3460 mutation in heteroplasmic fashion without

carrying the 7444 mutation. He lost his sight at age 14 but it recovered to 1.2 OD and 0.7 OS about two years and half after the onset. The difference in final visual acuity between these two patients may reflect the degree of reduction in mitochondrial energy production. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:728-734, 1995)

Key words: Leber's hereditary optic neuropathy, Mitochondrial DNA, 3460 mutation, 7444 mutation, Visual recovery

別刷請求先: 160 東京都新宿区信濃町 35 慶応義塾大学医学部眼科学教室 小口 芳久
(平成 6 年 9 月 22 日受付, 平成 7 年 1 月 26 日改訂受理)

Reprint requests to: Yoshihisa Oguchi, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine Keio University,
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

(Received September 22, 1994 and accepted in revised form January 26, 1995)

I 緒 言

レーベル視神経症は、主に10~20代の男性において、両眼性に急性または亜急性の視力低下で発症し、数か月後に視神経萎縮に至る予後不良な遺伝性の視神経疾患である¹⁾。中心暗点を来すため、多くの症例で最終視力は0.1以下となる。遺伝形式は母性遺伝であり²⁾、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の遺伝形式³⁾と一致することから、1988年Wallaceら⁴⁾はmtDNAの11778番目の塩基であるグアニン(G)からアデニン(A)への点突然変異がレーベル視神経症の発症に強く関連することを報告した。この点突然変異は電子伝達系酵素複合体I (NADH dehydrogenase, ND) のサブユニット4 (ND4) 遺伝子領域内の塩基置換であり、それに伴いコードされたアミノ酸(コドン340)はアルギニンからヒスチジンに変化している。その後、世界中でレーベル視神経症患者においてこの点突然変異が検索され、レーベル視神経症の40~90%の症例に11778変異がみられた⁵⁾。現在までにレーベル視神経症の発症と強く関連する、いわゆる一義的変異(またはprimary mutation)⁵⁾⁶⁾として11778変異の他に3460変異⁷⁾⁸⁾、4160変異⁹⁾、15257変異¹⁰⁾¹¹⁾、14484変異¹²⁾が明らかになり、また最近では9438変異¹³⁾、9804変異¹³⁾、そして14459変異¹⁴⁾が報告されている。ただ、15257変異に関しては一義的変異かどうか異論もある¹⁵⁾。Johnsら¹³⁾は、約73%のレーベル視神経症患者は電子伝達系酵素複合体I内の遺伝子変異をもち、約7%に電子伝達系酵素複合体III (ubiquinone: cytochrome c oxidoreductase) 内のcytochrome b (Cytb) 遺伝子内の15257変異、約4%に電子伝達系酵素複合体IV (cyto-

chrome c oxidase, CO) 内のCOIII遺伝子内の9438変異、9804変異をもつと報告している。

今回我々は、臨床経過および家族歴からレーベル視神経症と診断した20家系のうち、11778変異がみられなかった3家系のうち1家系においてミトコンドリア遺伝子のND領域の全塩基配列決定を行った。その結果、3460変異を認めため、本症例の臨床経過とmtDNAの解析結果を報告する。さらに、原因不明の両眼性の視神経炎で発症し視神経萎縮に至った30人をスクリーニングした結果、1人にこの変異がみられた。

II 実験方法

1. 症 例

症例1: 19歳, 男性。

主 訴: 両眼の視力低下。

初 診: 昭和63年6月27日。

既往歴: 特記すべきことなし。

家族歴: 従兄弟2人, 叔父が視神経萎縮と診断されている(図1)。

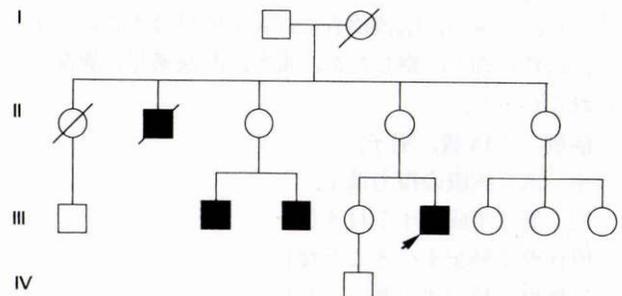


図1 症例1の家系図。



図2 症例1の眼底所見(急性期)。

乳頭の発赤腫脹, 拡張性微細血管は著明ではない。

現病歴：4月末頃から両眼の視力低下に気づき、その後徐々に進行し、5月頃から視野の中心部に斑状のものが大きくなってきたため、慶應義塾大学病院眼科を受診した。

初診時所見および経過：右眼視力は0.04 (0.06×-2.0 D=cyl-0.5 DA 60°), 左眼視力は0.05 (0.08×-2.0 D=-0.25 DA 145°), 対光反射は正常であった。眼位、眼球運動に異常はみられなかった。眼底所見は、視神経乳頭の色調は軽度発赤を示し、耳側はやや蒼白であった。輪郭も明瞭であった。乳頭上および網膜血管にも異常はみられなかった(図2)。蛍光眼底造影検査では特に異常所見は認められなかった。Goldmann 定量視野検査で両眼に中心暗点を認めた。電気生理学的検査はキセノン閃光刺激による VEP では潜時は正常範囲内であったが、振幅は低値を示した。眼底所見は典型的ではないが、家族歴よりレーベル視神経症が疑われたのでミトコンドリア DNA の 11778 変異の有無を検査したが、陰性であった。視力はその後徐々に低下し、平成4年4月には右眼視力は0.02 (矯正不能), 左眼視力は0.04 (矯正不能) で、両眼の中心暗点と視神経萎縮を認めた。心電図、脳波検査には異常所見はみられなかった。母親、姉も診察したが、視力、眼底所見に異常はみられなかった。

症例2：14歳、男子。

主訴：両眼の視力低下。

初診：平成3年7月4日。

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：平成3年1月頃から右眼の視力低下に気づき、近医眼科を受診した。その後2月頃から左眼の視力も徐々に低下したため、両眼の視神経炎の疑いで副腎皮質ステロイド薬の点滴および内服治療を受けたが、視力の改善がみられなかったため、産業医科大学病院眼科を紹介された。

初診時所見および経過：右眼視力は0.02 (矯正不能),

左眼視力は0.02 (矯正不能) であった。眼位、眼球運動に異常はみられなかった。眼底所見では、視神経乳頭は軽度発赤していたが、耳側はやや蒼白であった。乳頭周囲の微細血管症は明らかではなかった。Goldmann 定量視野検査で両眼に中心暗点を認めた。電気生理学的検査はキセノン閃光刺激による VEP では潜時はほぼ正常範囲内であったが、振幅低値を示した。平成3年9月、慶應義塾大学眼科でミトコンドリアの DNA 診断をしたが、11778 変異は陰性であった。その後、中心暗点は徐々に拡大し、視力も平成4年1月には両眼とも0.01 と低下したが、同年3月頃から両眼とも徐々に回復傾向がみられた。同年7月には両眼とも(0.1), 平成5年1月には右眼(0.5), 左眼(0.3), 同年6月には右眼(1.0), 左眼(0.7) となり、平成6年8月まで右眼視力は0.8 (1.2×-0.5 D), 左眼視力は0.7 (矯正不能) と変化はない。平成6年8月の Goldmann 視野検査では比較中心暗点が残(図3), 視神経乳頭には視神経萎縮を認める。母親、妹は診察したが異常所見はみられなかった。また、問診による家系調査では高度の視力障害者はいなかった。

2. 分子生物学的解析

1) 電子伝達系酵素複合体 I (ND) 領域のクローニングと塩基配列決定

症例1の発端者およびその母親から本研究のための同意を得た後、へパリン採血(10 ml) し、Hirt 氏法により mtDNA を抽出した¹⁶⁾。

表1のプライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR) 法で ND 領域を6か所に分けて増幅した。PCR 産物は、ND4 領域以外は図4に示した各制限酵素で切断後、M13 ファージベクターにサブクローニングした。M13 ベクターのクローニングサイトとして、*Sma* I, *Bam* HI-*Sma* I, *Acc* I, *Acc* I-*Bam* HI, *Acc* I-*Eco* RI, *Bam* HI-*Eco* RI の6種類を用いた。ND4 領域は2つに分け(i と ii), それぞれ M13 ファージベクターの *Sma* I サイトにサブクローニングした。塩基配列決定法は、1

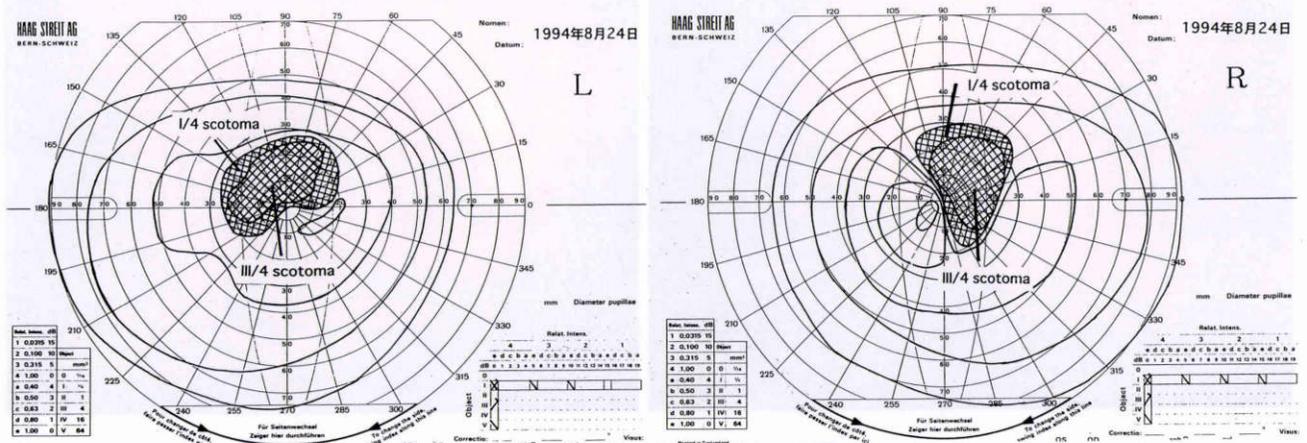


図3 症例2の Goldmann 視野 (視力回復後)。

表 1 電子伝達系酵素複合体 I 領域を増幅するために用いた polymerase chain reaction プライマー

遺伝子	プライマー配列	塩基番号	PCR 産物
ND1	CAGTCAGAGGTTCAATTCCCT	3,275-3,294	1,021 bp
	*CGGGATCC-TAACTCTTTTATCAGACATA	4,287-4,268	
ND2	GGTTATACCC TTC CGTACT	4,449-4,468	1,091
	*CGGGATCC-TGTATTTAACCTAAATTTCT	5,531-5,512	
ND3-4L	*CGGGATCC-GACAACATTCAAAAAAGAGTA	10,038-10,057	784
	GGAAAGTCATGTCAGTGGTA	10,813-10,794	
ND4(i)	ACGTACATAACCTAAACCTA	10,735-10,754	865
	GTAGGCAGATGGAGCTTGTT	11,591-11,572	
ND4(ii)	ACGCCTCACACTCATTCTCA	11,491-11,510	695
	TCAGATTCACAATCTGATGT	12,177-12,158	
ND5-6	*CGGGATCC-GTGCAACTCCAAAATAAAAGT	12,316-12,335	2,389
	TGGTTGTAGTCCGTGCGAGA	14,696-14,677	

*: クローニングサイトを作るために 8 塩基を付けてある太字, 下線部分は制限酵素 *Bam* HI の認識部分

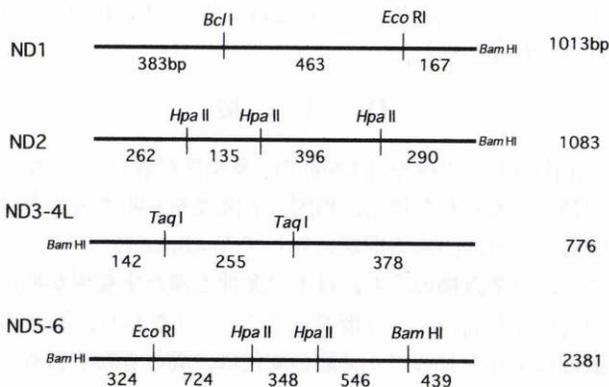


図 4 ND 領域を PCR 法で増幅した制限酵素地図 (症例 1)。

地図で示した制限酵素で切断後, M 13 ファージベクターにサブクローニングした。数字は DNA 断片の長さ (bp: 塩基対) を示す。

本鎖 DNA を精製し, Dye Primer Cycle Sequencing Kit (ABI 社) を用いて, 全自動 DNA シークエンサー (37 3 A ABI 社) で塩基配列を決定した。

2) 3460 変異 (ND 1 領域) のスクリーニング

3460 番塩基の置換 (G → A) により, 制限酵素 *Bsa* HI 認識部位が消失するので, PCR 産物を *Bsa* HI で消化し, この塩基置換に関して正常人 60 人および原因不明の両眼性視神経萎縮症患者 30 人において検索した。プライマーとして, 5'-CACACCCACCCAAGAAGGG-3' (3206~3226) と 5'-GAGATTGTTTGGGCTACTGCT-3' (3728~3708) を用いた。PCR 産物は 523 bp で, 正常人では *Bsa* HI 消化にて 253 bp と 270 bp に二分される。

3) 5178 変異 (ND 2 領域) のスクリーニング

5178 番塩基の置換 (C → A) により制限酵素 *Alu* I 認識部位が消失するので, この塩基置換に関して正常人 60 人の ND 2 領域の PCR 産物をスクリーニングした。

4) 11696 変異 (ND 4 領域) のスクリーニング

11696 番塩基の置換 (G → A) により, 認識部位の変化

を来す制限酵素がなかったため, allele specific oligonucleotide プローブを用いて正常人 60 人の ND 4 領域の PCR 産物をスクリーニングした (ASO 法)¹⁷⁾。変異検出のためのプライマーは 5'-GGCGCAATCATTCTCAT-AAT-3' (11690-11709, 下線部が 11696 番塩基置換を示す)。

5) 7444 変異 (COI 領域)¹⁸⁾, 15812 変異 (Cytb 領域)¹⁰⁾ のスクリーニング

ND 領域以外の 2 つの二義的変異 (または secondary mutation)⁵⁾⁶⁾である COI 遺伝子領域の 7444 番塩基の置換 (制限酵素 *Xba* I サイト消失) と, Cytb 遺伝子領域の 15812 番塩基の置換 (制限酵素 *Rsa* I サイト消失) について PCR 法および制限酵素消化法により検索した。用いたプライマーは 7444 変異では, 5'-TTTGAGAAGCCTTCGCTTCG-3' (7318~7327) と, 5'-CGGGAGTACTACTCGATTGT-3' (8020~8001), 15812 変異では 5'-CTAAGCCAATCACTTTATTG-3' (15704~15723) と 5'-TATTTTGTTTTCAATTAGGG-3' (15874~15855) である。

III 結 果

1. ND 1 領域の 3460 変異

症例 1 の ND 領域の全塩基配列を決定した結果, 15 か所の塩基置換とそれに伴い 5 か所のアミノ酸置換がみられた (表 2)。そのうち, 本症例においては一義的変異⁶⁾である 3460 番の塩基置換 (G → A) がみられたが (図 5), 15 個のクローンすべてが G → A であった。また, 症例 1 の発端者の母親にも 3460 変異がみられた (図 6)。

3460 変異により制限酵素 *Bsa* HI 認識部位が消失するので, これを利用して正常人 60 人の mtDNA を検査したが変異はみられなかった。また, 他の 11778 番塩基変異陰性のレーベル視神経症 2 家系と両眼性視神経萎縮症患者 30 人においても 3460 変異をスクリーニングした結果, 後者において 1 人に 3460 変異がヘテロプラスミーとしてみられた (症例 2, 図 6)。PCR 産物の塩基配列を決

表2 症例1の電子伝達系酵素複合体I(ND)内に見つかった塩基置換とアミノ酸の変化

遺伝子	塩基番号	塩基置換	コドン番号	アミノ酸の変化
ND1	3,423	G→T	39	Val 変化なし
	3,460	G→A	52	Ala → Thr
	3,894	C→T	196	Thr 変化なし
ND2	4,769	A→G	100	Met 変化なし
	4,883	C→T	138	Pro 変化なし
	5,099	C→T	210	Ile 変化なし
	5,178	C→A	237	Leu → Met
ND3	10,398	A→G	114	Thr → Ala
ND4	10,873	T→C	38	Pro 変化なし
	11,335	T→C	192	Asn 変化なし
	11,696	G→A	313	Val → Ile
	11,719	G→A	320	Gly 変化なし
ND5	12,705	C→T	123	Ile 変化なし
	13,702	G→C	456	Gly → Arg
ND6	14,668	G→A	2	Met 変化なし

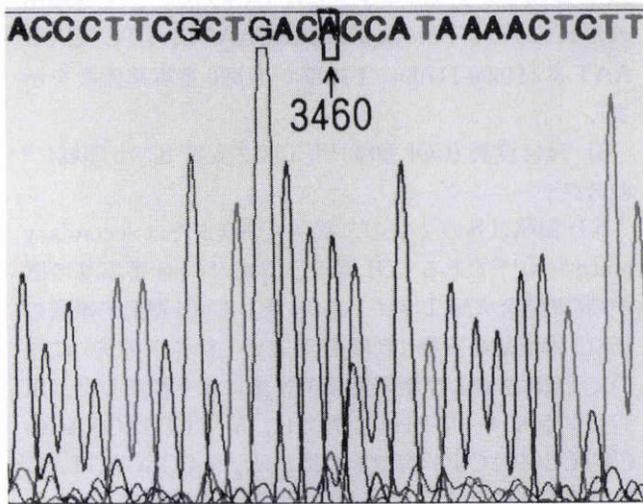


図5 3460番塩基におけるGからAへの変異(症例1).

定したが、10個のクローンのうち7個のクローンに3460番の塩基置換(G→A)がみられ、3個には塩基置換がみられなかった。

2. ND2領域の5178変異

制限酵素 (*Alu* I) 法で正常人60人をスクリーニングした結果、正常人2人にこの変異がみられた。

3. ND4領域の11696変異

ASO法で正常人60人をスクリーニングした結果、正常人2人にこの変異がみられた。

4. COI領域の7444変異

症例1の発端者および母親において *Xba* I サイトが消失し変異がみられた。PCR産物の塩基配列決定法により、7444番塩基がグアニンからアデニンに変化していた。*Rsa* I サイトは正常であり、15812変異はみられなかった。一方、症例2においては7444変異、15812変異はみられなかった。

IV 考 按

mtDNAは人種や、個体間での多型性が著しく、一塩基置換が認められた場合、病因との関連を証明することは困難であった。この問題に対してWallaceら⁴⁾のグループは、塩基置換のうち、以下の条件を満たす変異が病因の可能性が高いという仮説を立てた。すなわち、①塩基置換により生じるアミノ酸の変化は、異なる動物種族間で保存性の高いアミノ酸に変化を生じること、②同一疾患の患者に共通してみられること、③正常人には認められないことである。この方法論により、レーベル視神経症の発症と強く関連する11778変異⁴⁾、3460変異⁷⁾⁸⁾、14484変異¹²⁾、そして最近では9438変異¹³⁾、9804変異¹³⁾、14459変異¹⁴⁾が明らかになった。

3460変異は、1991年、Houponenら⁷⁾はフィンランド人2家系のND1領域の全塩基配列を解析し、上述した方法によりレーベル視神経症と関連する3460番塩基の

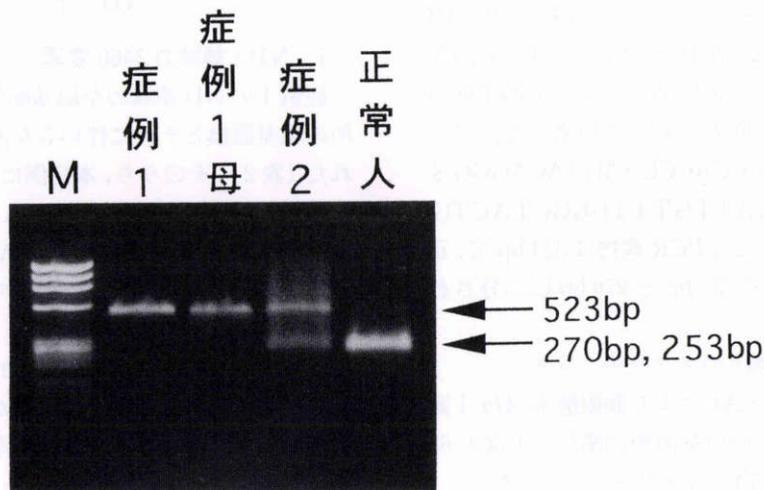


図6 3460変異の制限酵素 *Bsa* HI による検出。症例2はヘテロプラスミーを示す。M：サイズマーカー

GからAへの変異を見出した。同年, Howellら⁸⁾も3460変異をもつイギリス人5家系およびオーストラリア人1家系を報告し, 1992年にはアメリカ人9家系¹⁹⁾, ヘテロプラスミーを示したイタリア人1家系²⁰⁾とフランス人1家系²¹⁾が報告された。現在, レーベル視神経症患者における3460変異の頻度は8~25%とされ⁵⁾, 11778変異に次いで多い変異である。一方, この変異は200人以上の正常人にはみられない⁵⁾。3460番塩基のGからAへの塩基置換により, 52番目のアミノ酸(コドン52)であるアラニンがスレオニンに変化している。このアミノ酸は多くの種族でアラニンが保存されている⁸⁾。

我々も1家系においてND領域の全塩基配列を決定したところ, 5か所にアミノ酸の置換がみられた。これらのうち, ND3領域のコドン114(10398番塩基置換)⁴⁾, そしてND5領域のコドン456(13702番塩基置換)⁴⁾⁸⁾の変化は多型としてすでに報告されたものであった。また, 残りの3つのアミノ酸の置換のうち, コドン237(5178番塩基置換)とコドン313(11696番塩基置換)の変異は種族保存性がみられたアミノ酸の置換であったが正常人にもみられたため, 多型であることが判明した。したがって, ND1領域のコドン52のアミノ酸置換は保存されたアミノ酸の置換であり, 正常人にはみられなかったため, 本症例では主に, Houponenら⁷⁾の報告したコドン52の変異, すなわち, 3460番塩基の変異が発症に強く関与した変異と考えられた。

今回, 欧米人とは遺伝的背景の異なる日本人においても3460変異がみられ, 日本人の正常人60人には同変異はみられなかったことから, この変異はレーベル視神経症と関連の強い変異であるといえる。さらに, Brownら¹⁶⁾は3460変異と酵素複合体IVのCOI遺伝子変異である7444変異を持ったレーベル視神経症1家系を報告し, 7444変異はレーベル視神経症の発症と中等度の関連がある変異(二義的変異)とした。現在まで7444変異に関する報告は少なく, 一義的変異との合併は3460変異以外にはない。3460変異と7444変異の合併の報告例¹⁸⁾²²⁾としては, 本症例は世界で3例目である。レーベル視神経症における3460変異と7444変異との関連は不明である。7444変異は, 7444番目の塩基であるGがAに変異し, それにより本来mtDNAの翻訳終了コドン(AGA)がリジンのコドン(AAA)に変化することにより3つのアミノ酸が多い蛋白質となり, それにより酵素活性(シトクロムc酸化酵素)が約40%低下する¹⁸⁾。したがって, 酸化リン酸化によるミトコンドリアのエネルギー産生能は, 症例1では3460変異単独例よりもさらに低下することになる。また, 一義的変異に合併する二義的変異として比較的頻度の高い7種類の変異が報告⁵⁾⁶⁾されているが, そのうち7444変異以外はみられなかった。

症例1の臨床所見は11778変異²³⁾²⁴⁾のものとはほぼ変わらないが, 眼底所見では比較的急性期ではあったが, 拡

張性微細血管症, 乳頭の発赤などの所見に乏しかった。同様の報告がイタリア人1家系において報告²⁰⁾されている。また, アメリカ合衆国の3460変異の症例でもレーベル視神経症に典型的な乳頭周囲の拡張性微細血管症²⁵⁾は9例中3例にしかみられない²⁶⁾。したがって, 3460変異のレーベル視神経症では11778変異に比べ, 急性期に特徴的な眼底所見に乏しい症例が多いと思われた。この場合, 家族歴がないと眼底所見からはレーベル視神経症の診断は困難である。

さらに, 3460変異の特徴は11778変異に比べ, 視力回復率が比較的高いことと, 家族内で2人以上の発症患者をもつ家系の割合が多いこと(すなわち, 家族歴を示す症例が多い), 大量のタバコやアルコールの摂取といった環境因子の影響を受けやすいことが報告²⁶⁾されている。症例1および2では環境因子は問診上は見出せなかった。3460変異のレーベル視神経症患者の視力回復率は, アメリカ合衆国では11778変異の4%²⁷⁾に対して22%(5/23人)²⁶⁾, イギリスでは29%(2/7人)²⁸⁾と報告されている。症例2は視力回復を示したが, 本邦では他に1例3460変異のレーベル視神経症患者の報告があり, 視力は軽度回復している(右眼は0.3, 左眼は0.1)²⁹⁾。症例2では, 発症時の年齢が14歳と比較的若かったこと, 3460変異がヘテロプラスミーであったこと, 症例1でみられたレーベル視神経症発症に中等度に関与するといわれる他のmtDNA変異(7444変異)¹⁸⁾の合併がみられなかったことが症例1とは異なっており, それが最終視力結果の差と関連していることも考えられた。

文 献

- 1) Miller NR: The hereditary optic neuropathies. In: Walsh and Hoyt's clinical neuro-ophthalmology, 4th ed, Vol 1. Williams & Wilkins, Baltimore, 311-317, 1982.
- 2) Nikoskelainen EK, Savontaus ML, Wanne OP, Katila MJ, Nummelin KU: Leber's hereditary optic neuroretinopathy, a maternally inherited disease: A genealogic study in four pedigrees. Arch Ophthalmol 105: 665-671, 1987.
- 3) Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA 77: 6715-6719, 1980.
- 4) Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, et al: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science 242: 1427-1430, 1988.
- 5) Newman N: Leber's hereditary optic neuropathy new genetic considerations. Arch Neurol 50: 540-548, 1993.
- 6) Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, MacDonald I, Wallace DC: Leber's hereditary optic neuropathy: A model for mitochondrial neurodegenerative diseases. FASEB J 6: 2791-2799, 1992.

- 7) **Houponen K, Vilkki J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus ML**: A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 48: 1147—1153, 1991.
- 8) **Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, et al**: Leber hereditary optic neuropathy: Identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet* 49: 939—950, 1991.
- 9) **Howell N, Kubacka I, Xu M, McCullough DA**: Leber hereditary optic neuropathy: Involvement of the mitochondrial ND 1 gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. *Am J Hum Genet* 48: 935—942, 1991.
- 10) **Johns DR, Neufeld MJ**: Cytochrome b mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 1358—1364, 1991.
- 11) **Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torroni A, Yang CC, Wallace DC**: Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics* 130: 163—173, 1992.
- 12) **Johns DR, Neufeld MJ, Park RD**: An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1551—1557, 1992.
- 13) **Johns DR, Neufeld MJ**: Cytochrome c oxidase mutations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 810—815, 1993.
- 14) **Jun AS, Brown MD, Wallace DC**: A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci* 91: 6206—6210, 1994.
- 15) **Oostra RJ, Bolhuis PA, Zorn-Ende I, de Kok-Nazaruk MM, Bleeker-Wagemakers EM**: Leber's hereditary optic neuropathy: No significant evidence for primary or secondary pathogenicity of the 15257 mutation. *Hum Genet* 94: 265—270, 1994.
- 16) **真島行彦, 小口芳久, 植村恭夫, 工藤 純, 堺 弘介, 清水信義**: レーベル病 (Leber's hereditary optic neuropathy) の DNA 診断. *日眼会誌* 94: 683—687, 1990.
- 17) **Kogan SC, Gitschier J**: Genetic prediction of hemophilia A. In: *Innis MA, et al (Eds): PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, 288—299, 1990.
- 18) **Brown MD, Yang CC, Trounce I, Torroni A, Lott MT, Wallace DC**: A mitochondrial DNA variant, identified in Leber hereditary optic neuropathy patients, which extends the amino acid sequence of cytochrome c oxidase subunit I. *Am J Hum Genet* 51: 378—385, 1992.
- 19) **Johns DR**: Mitochondrial ND-I mutation in Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 50: 872—874, 1992.
- 20) **Howell N, McCullough D, Bodis-Wollner I**: Molecular genetic analysis of a sporadic case of Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 50: 443—446, 1992.
- 21) **Labalette P, Hache JC, Hemery B, Puech B, Francois P, Dumur V, et al**: Diagnosis of Leber's hereditary optic neuropathy without neurological abnormalities. *Lancet* 340: 368, 1992.
- 22) **Houponen K, Lamminen T, Juvonen V, Aula P, Nikoskelainen E, Savontaus ML**: The spectrum of mitochondrial DNA mutations in families with Leber hereditary optic neuropathy. *Hum Genet* 92: 379—384, 1993.
- 23) **Newman NJ, Lott MT, Wallace DC**: The clinical characteristics of pedigrees of Leber's hereditary optic neuropathy with the 11778 mutation. *Am J Ophthalmol* 111: 750—762, 1991.
- 24) **篠田 啓, 緋田芳樹, 真島行彦, 小口芳久**: ミトコンドリア DNA の nt11778 遺伝子変異をもつレーベル視神経症16家系の臨床所見. *臨眼* 47: 1727—1730, 1993.
- 25) **Nikoskelainen E, Hoyt WF, Nummelin K**: Ophthalmoscopic findings in Leber's hereditary optic neuropathy II. The fundus findings in the affected family members. *Arch Ophthalmol* 101: 1059—1068, 1983.
- 26) **Johns DR, Smith KH, Miller NR**: Leber's hereditary optic neuropathy clinical manifestations of the 3460 mutation. *Arch Ophthalmol* 110: 1577—1581, 1992.
- 27) **Stone EM, Newman NJ, Miller NR, Johns DR, Lott MT, Wallace DC**: Visual recovery in patients with Leber's hereditary optic neuropathy and the 11778 mutation. *J Clin Neuro-ophthalmol* 12: 10—14, 1992.
- 28) **Mackey DA**: Three subgroups of patients from the United Kingdom with Leber hereditary optic neuropathy. *Eye* 8: 431—436, 1994.
- 29) **Nakamura M, Tanigawa M, Yamamoto M**: A case of Leber's hereditary optic neuropathy with a mitochondrial DNA mutation at nucleotide position 3460. *Jpn J Ophthalmol* 38: 267—271, 1994.