

# Myoclonus Epilepsy Associated with Ragged-Red Fibers (MERRF) の病因に関する 分子遺伝学的研究

新潟大学脳研究所神経内科学教室 (主任: 宮武 正教授)

米 田 誠

Molecular Genetic Analysis for Myoclonus Epilepsy  
Associated with Ragged-Red Fibers (MERRF)

Makoto YONEDA

*Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University*  
(Director: Prof. Tadashi MIYATAKE)

Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) is a clinical phenotype of mitochondrial disease, which is characterized by myoclonus, ataxia, epilepsy, and myopathy. Although MERRF shows maternal inheritance consistent with a mtDNA mutation, the primary genetic defect of the disease has not been yet identified. We determined ninety-eight percent of the nucleotide sequence of muscle mtDNA obtained from a pathologically proven MERRF patient to elucidate the genetic cause of the disease. We performed direct sequencing of polymerase chain reaction (PCR) products or sequencing of cloned PCR products of mtDNA from this patient. Nucleotide sequence analysis revealed 33 single base substitutions, containing 23 substitutions in coding regions of the mtDNA and 10 in non-coding regions, compared with normal human mtDNA sequence reported by Anderson *et al.* Although three base substitutions would result in substitutions of amino acids, which are conserved among species, all three MERRF patients had an identical A to G base substitution at nucleotide position 8344 in the tRNA<sup>Lys</sup> region. The A residue is highly conserved among species. The base substitution was not found in 15 controls. Various degrees of the combined enzymic defects in the oxidative phosphorylation system of mitochondria might be explained by altered function or structure of the mutant tRNA<sup>Lys</sup>. We studied five more cases from three independent families to know if all patients have the same mutation, and

Reprint requests to<sup>L</sup> Makoto YONEDA,  
Department of Neurology, Brain Research  
Institute, Niigata University, Niigata 951,  
JAPAN.

別刷請求先<sup>L</sup> 〒951 新潟市旭町通り 1-757  
新潟大学脳研究所神経内科学教室

米 田 誠

found this mutation in all patients by PCR-Restriction fragments length polymorphism (RFLP) with a mismatch primer. The mutation in tRNA<sup>Lys</sup> was shown in all the patients. In addition, all MERRF patients have very small amount of wild type sequence. As leucocytes mtDNA from the patients also have the mutation, genetic diagnosis of the disease without muscle biopsy is capable.

Key words: mitochondrial disease, MERRF, mitochondrial DNA, tRNA<sup>Lys</sup>, sequencing  
ミトコンドリア病, MERRF, ミトコンドリア遺伝子, tRNA<sup>Lys</sup>, 塩基配列

## I. 緒 言

ミトコンドリアエネルギー産生系の障害によって多彩な臨床症状をとりうる疾患群がミトコンドリア脳筋症あるいはミトコンドリア病という概念として提唱され<sup>1)</sup>, この中には Kearns-Sayre 症候群 (KSS) あるいは慢性進行性外眼筋麻痺 (chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO), mitochondrial encephalopathy, myopathy, lactic acidosis and strokelike episodes (MELAS)<sup>2)</sup>, Leber 遺伝性視神経萎縮症<sup>3)</sup> などの臨床型が存在する。

Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (MERRF) は, ミオクロス, てんかん, 小脳失調, ミオパチーを主徴とする疾患であり, 時に痴呆, 足変形, 感音性難聴, 視神経萎縮などをともなう。骨格筋生検で筋鞘膜下に異常なミトコンドリアの集族を示す赤く縁どりされた筋線維 (regged-red fiber: RRF) が見いだされることからミトコンドリアのエネルギー産生系の異常が病因として考えられており, ミトコンドリア病の臨床型の一つとして考えられている<sup>4)</sup>。MERRF は母性遺伝を呈することからミトコンドリア DNA (mtDNA) の異常が病因と推察されているが, いまだ mtDNA の変異は特定されていない。

近年, ミトコンドリア病における遺伝子解析が精力的に進められ, KSS あるいは CPEO においてミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) の欠失が病因として見いだされた<sup>5)6)</sup>。ミトコンドリア遺伝子は核遺伝子に比べ10数倍の頻度で塩基置換が生じるため, 正常人の間でも高頻度で多型性を有する<sup>7)</sup>。そのため, mtDNA に塩基置換を見い出しても, それが正常の多型性によるものか病因となる塩基置換であるのかを鑑別することが困難である。ところが, Leber 遺伝性視神経萎縮症において, 種間での保存性の高いアミノ酸を置換する塩基置換が病因となる可能性が高いという仮説から mtDNA の一塩基置換が病因として見いだされ, ミトコンドリア病の病因解

明のための有効な strategy と考えられている<sup>8)9)</sup>。

本研究においては, MERRF の病因となる塩基変異を同定することを目的とし, mtDNA の分子遺伝学的解析およびミトコンドリア酸化的リン酸化系の生化学的検討を行った。

## II. 分析対象と研究方法

### A. 分析症例

症例1及び2は本症の疾患概念が最初に提唱された際に報告された2例<sup>4)</sup>である。症例3は67歳の女性で, 55歳頃より小脳失調, 動作性ミオクロス, てんかん, ミオパチーを呈し, 筋生検で RRF が認められている。症例4は症例3の息子である。それぞれの症例の臨床および検査所見については Table 1 に示した。いずれの

Table 1 Clinical features in patients with MERRF

Patient Family	*P1 1	*P2 2	P3 3	P4 4
			3	
Age (y/o)/Sex	20/M	30/F	67/F	25/M
Onset (y/o)	14	C	55	C
Familial incidence	(+)	(+)	(+)	(+)
Myoclonus	(+)	(+)	(+)	(+)
Epilepsy	(+)	(+)	(+)	(+)
Ataxia	(+)	(+)	(+)	(+)
Myopathy	(+)	(+)	(+)	(+)
Dementia	(+)	(+)	(+)	(+)
Foot deformity	(+)	(+)	(-)	(-)
Hearingloss	(-)	(+)	(+)	(-)
Optic atrophy	(+)	(-)	(-)	(-)
Retinal pigmentation	(-)	(-)	(-)	(-)
Heart block	(-)	(-)	(-)	(-)
Stroke-like episodes	(-)	(-)	(-)	(-)
Elevation of L/P	(+)	(+)	(+)	(+)
Ragged-red fibers	(+)	(+)	(+)	(+)

\* pathologically proven cases reported by Fukuhara *et al.* (1980) C, childhood

症例も母性遺伝として矛盾しない家族歴を有し、MERRFの中核症状であるてんかん、小脳失調、ミオクロスム、ミオパチーを有し、ミトコンドリアエネルギー産生系の異常を示唆する血中乳酸・ピルビン酸の上昇と骨格筋生検で RRF を認めている。他のミトコンドリア脳筋症との鑑別上問題となる脳卒中様発作、網膜色素変性、心伝導障害はいずれの症例でも認められていない。以上のように、対象とした症例は臨床的に典型的 MERRF の症例と考えられる。

## B. 研究方法

### 1. 組織からの DNA 抽出

各凍結組織（症例1；凍結剖検骨格筋，症例2；凍結剖検脳，症例3および4；凍結生検骨格筋）よりの DNA の抽出は既報に準じた<sup>6)</sup>。

### 2. オリゴヌクレオチドの合成

Polymerase chain reaction (PCR)<sup>10)</sup> に使用したオリゴヌクレオチドは Applied Biosystem model 391 DNA synthesizer を用いて合成した。

### 3. Polymerase chain reaction

100~200 ng の DNA を鋳型として、12.5 nmole の dNTP, 2.5 unit の Taq DNA polymerase (AmpliTaQ, Cetus) 存在下で 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin を含む反応液 (100 $\mu$ ) 中で25回の PCR を行った。第1段階の symmetrical PCR は一対の同量 (20 pmole) のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い行い、第2段階の asymmetrical PCR は異なる量のオリゴヌクレオチド (20 pmole, 0.2 pmole) をプライマーとして用い行った。いずれの反応も Perkin-Elmer/Cetus Thermal Cycler を用い、熱変性 94 $^{\circ}$ C, 30 秒、伸長反応 73 $^{\circ}$ C, 3 分、アニーリング 50 $^{\circ}$ C, 15 秒の条件で行い、最後に 7 分間の伸長反応を加えた。

### 4. PCR 増幅 DNA 断片のサブクローニング

Symmetrical PCR によって増幅した DNA 断片を 1% SeaPlaque gel (FMC Bioproducts) 上で電気泳動した後、DNA 断片を含むゲルを切り出し抽出後、pUC 19 あるいは pBlueScript KS<sup>-</sup> プラスミドベクターに

サブクローニングした。

### 5. PCR 増幅 DNA 断片の直接塩基配列の決定

Asymmetrical PCR を前述の条件で行った後、余分なオリゴヌクレオチドを Centricon-30 microconcentrator (Amicon) を通すことによって取り除いた。各シーケンス反応は、0.5 pmole のプライマーを加えた後、5 分間の煮沸、氷冷によってアニーリングを行い、dideoxynucleotide chain-terminator reaction<sup>11)</sup> を行った。

### 6. クローン化 PCR 増幅 DNA 断片の塩基配列の決定

二本鎖プラスミドを鋳型として用い dideoxynucleotide chain-terminator reaction を行った<sup>11)12)</sup>。

### 7. 酸化的リン酸化系酵素の活性測定

各症例組織（症例1及び2；凍結剖検骨格筋，症例3及び4；凍結生検骨格筋）からのミトコンドリアの単離は Bookelman ら方法に準じた<sup>13)</sup>。各酵素活性 NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I), succinate-ubiquinone oxidoreductase (Complex II), succinate-cytochrome *c* reductase (Complex II-III), ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase (Complex III), cytochrome *c* oxidase (Complex IV), ATPsynthetase (Complex V) の測定は既報に従った<sup>14)</sup>。

### 8. 酸化的リン酸化系サブユニットのイムノプロット

症例4の生検骨格筋より単離したミトコンドリアを SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動後、Duapore filter に Western blot 法により移し、牛心筋より精製した各複合体を免に免疫することによって得られた特異抗体を用いて、ミトコンドリアサブユニットを検出した<sup>14)</sup>。

## III. 結 果

### A. 患者骨格筋 mtDNA の塩基配列の解析

症例1の骨格筋 mtDNA の98%の領域（塩基番号 4523~4557, 8617~8746, 12544~12653 を除く）を分析し、Anderson らによって報告されている正常ヒト mtDNA の塩基配列 (Camb.)<sup>15)</sup> と比較して、33箇所の塩基置換

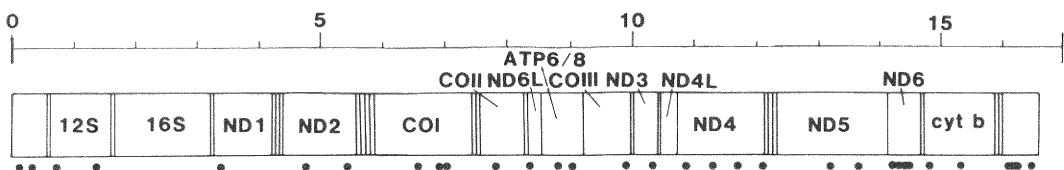


Fig. 1 Single base substitutions found in MERRF patient, compared to the normal human mtDNA sequence (Camb.)<sup>15)</sup>.

**Table 2** Twelve single base substitutions resulting in amino acid substitutions in the patient 1 are compared to the normal human mtDNA (Camb.) and other species sequences

nt position	Codon		Amino acid			
	Human	Patient	Human	Patient	Bovine	Mouse
*1. 6547 COI	T	C	L	P	L	L
2. 6898 COI	T	C	M	T	I	I
3. 8860 ATP 6	A	G	T	A	A	A
4. 10330 ND 3	C	T	S	F	S	T
*5. 11718 ND 4	G	A	G	E	G	G
6. 12092 ND 4	C	T	L	F	L	I
7. 13702 ND 5	G	C	G	R	R	R
8. 14199 ND 6	C	A	P	T	S	S
9. 14272 ND 6	C	G	F	L	F	V
10. 14368 ND 6	C	G	F	L	M	F
*11. 14858 CYTb	G	A	G	S	G	G
12. 15326 CYTb	A	G	T	A	M	I

Base substitutions in the ND6 gene are read as an L-strand codon.

\* Base substitutions resulting in amino acid substitutions which are conserved among species.

**Table 3** Ten single base substitutions in the non-coding regions in the patient 1 mtDNA

nt positions	Human, Camb	Patient 1
1. 73 D-loop	A	G
2. 263 D-loop	A	G
3. 750 12S	A	G
4. 1438 12S	A	G
5. 8344 t-RNA(Lys)	A	G
6. 16261 D-loop	C	T
7. 16268 D-loop	C	T
8. 16288 D-loop	T	C
9. 16311 D-loop	T	C
10. 16519 D-loop	T	C

が見いだされた。このうち23箇所の塩基置換がアミノ酸を規定している領域で、10箇所がそれ以外の D-loop, rRNA, tRNA 領域に含まれていた。

この23箇所の塩基置換のうちで、14箇所が NADH-dehydrogenase のサブユニット領域に、5箇所が cytochrome c oxidase, 2箇所が ATPase, 2箇所が cytochrome b 領域に位置していた (Fig. 1)。このう

ちの12箇所がアミノ酸の置換をきたすものであり、3箇所の塩基置換 (塩基番号 6547 の T から C, 11718 の G から A, 14858 の G から A) が human<sup>15)</sup>, bovine<sup>16)</sup>, mouse<sup>17)</sup> の間で保存されたアミノ酸を置換するものであった (Table 2)。

さらに、プロモーター領域を含む D-loop 領域中に7箇所、r-RNA (12S) 領域中に2箇所、tRNA<sup>Lys</sup> 領域中に1箇所の塩基置換が見いだされた。

アミノ酸規定領域以外の塩基置換のうちで、D-loop 領域の3箇所 (塩基番号 16261, 16311, 16519) については正常ヒト mtDNA の塩基置換として報告されており<sup>18)</sup>、本症の病因としては考えにくい (Table 3)。Fig. 2 に tRNA<sup>Lys</sup> 領域の塩基置換部位を含む領域の正常人及び患者の塩基配列解析結果を示す。塩基番号 8344 の位置の A から G への置換が見いだされる。

#### B. 酵素活性の測定およびイムノプロット

患者骨格筋のミトコンドリア酸化的リン酸化系の測定結果を Table 4 に示す。症例2において複合体IV (平均値の42%) の活性低下が、症例4において複合体I (13%) 及びIV (33%) の活性低下が認められた。症例4の骨格筋ミトコンドリア蛋白のイムノプロットの結果、一般的なサブユニットの低下が認められ、一つの酵素蛋

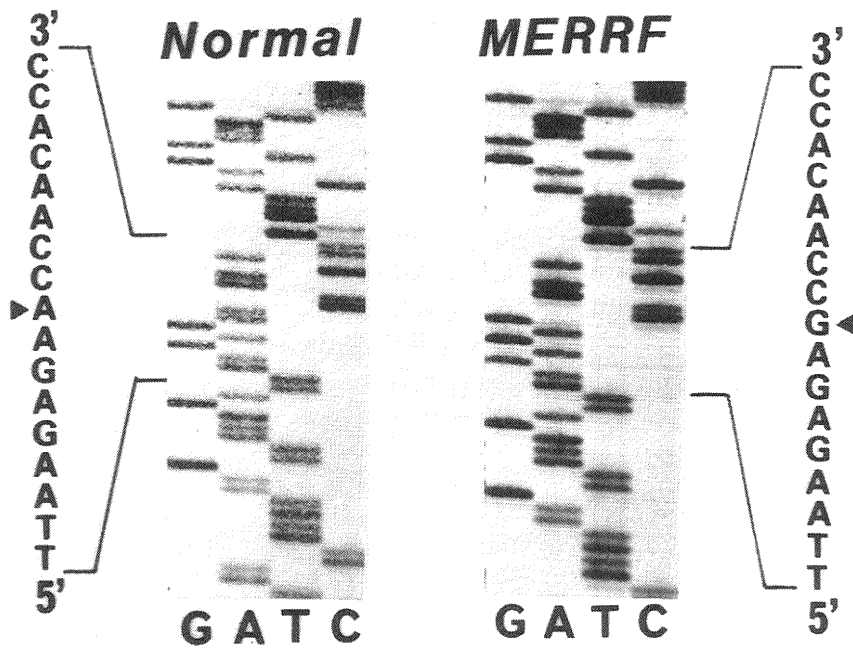


Fig. 2 The autoradiograms of DNA sequencing gel in the region containing tRNA<sup>Lys</sup> in normal control and MERRF patient. Arrowheads show the single base substitution.

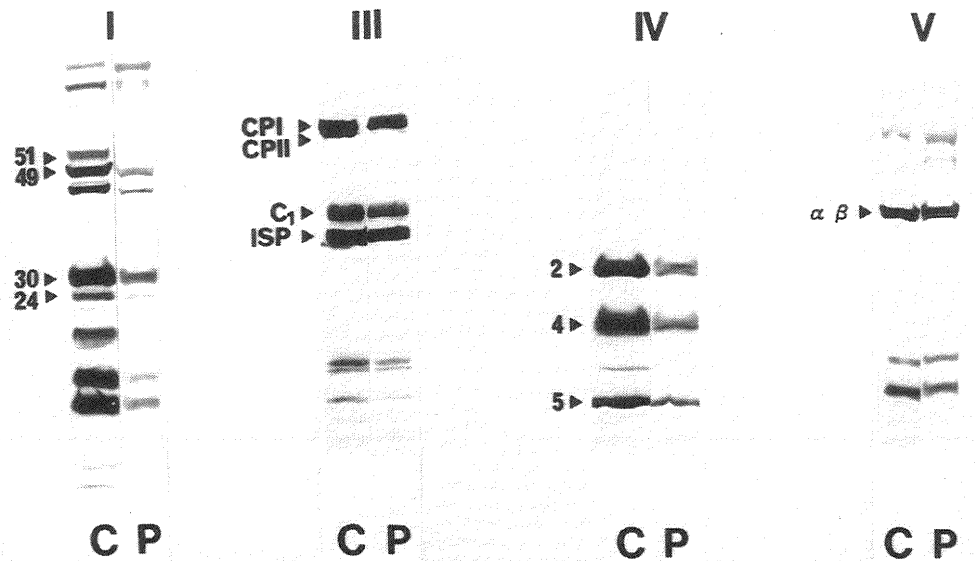


Fig. 3 Immunoblotting of muscle mitochondrial proteins of the patient 4 using specific antibodies against complexes. I, Complex I. III, Complex III. IV, Complex IV. V, Complex V. C, control. P, patient. CP, core protein. C<sub>1</sub>, cytochrome C<sub>1</sub>. ISP, iron sulfur protein.

**Table 4** Enzymic activities of the oxidative phosphorylation system of mitochondria in the patients with MERRF

Enzyme (mean±S.D.)	Patient 1 (%)	Patient 2 (%)	Patient 3 (%)	Patient 4 (%)
Complex I (146± 58)	207 (142)	120 ( 80)	143 ( 98)	19 ( 13)
Complex II (317± 64)	n.d.	315 ( 99)	n.d.	524 (165)
Complex II-III (145± 59)	199 (137)	n.d.	215 (147)	n.d.
Complex III (731±319)	n.d.	1313 (180)	n.d.	485 ( 66)
Complex IV (613±276)	664 (108)	258 ( 42)	851 (139)	201 ( 33)
Complex V ( 73± 22)	n.d.	126 (173)	n.d.	127 (174)

Values are expressed in nmole/min/mg mitochondrial protein. The enzymic activities of oxidative phosphorylation system in the patients' mitochondria are expressed as percentage of mean control values (n=7). n.d.; not determined.

白の遺伝子領域の異常を示唆するような特定のサブユニットの低下は認められなかった (Fig. 3).

#### IV. 考 案

MERRF の病因となりうる塩基置換として, アミノ酸の種間で保存性を考慮し 3 箇所の塩基置換 (塩基番号 6457, 11718, 14858) と tRNA<sup>Lys</sup> 領域の 1 箇所の塩基置換があげられた。さらにこれらの塩基置換の中で, 真に MERRF の病因となるものを見いだすため, 他の MERRF 患者がこれらの同様の塩基置換をもつかを比較検討した (Table 5)。塩基番号 6457 及び 11718 の塩基置換については他の二家系の MERRF 患者においては見いだされなかった。塩基番号 14858 の置換は他の二家系の MERRF 患者中の一人に見いだされたが, cyt b を含む複合体 II-III 及び複合体 III 活性がどの症例においても有意な低下を示していなかったことは, この領域の塩基置換が本症の病因として可能性が低いと考え

られた。

tRNA<sup>Lys</sup> 塩基番号 8344 の位置の A から G への置換はすべての症例に認められ本症の病因として最も可能性が高いと考えた。この塩基置換は tRNA<sup>Lys</sup> の TΨC loop の TΨC stem の 3' 側より 2 塩基下流に位置する<sup>16)</sup> (Fig.4)。*S. Cerevisiae* においては, 従来より多くの変異株が知られており, tRNA<sup>Asp</sup> の TΨC loop の塩基置換によって tRNA の高次構造や機能に障害をきたし, 酸化的リン酸化系の機能に障害をもたらすことが知られている<sup>19)</sup>。本症における tRNA<sup>Lys</sup> の塩基変異も同様に mtDNA で規定されたサブユニットの発現に影響する可能性がある。また, TΨC loop は一般に変異をおこしやすい部位であるが, この A 残基は多くの種間で保存されており<sup>15) 16) 17) 20) 21) 22)</sup>, tRNA<sup>Lys</sup> の高次構造上重要と考えられる (Fig. 5)。酸化的リン酸化系の酵素活性の測定では, 複数の複合体にまたがった障害が筆者の結果からも他の報告例<sup>23)</sup> から知られており,

**Table 5** Comparison of nucleotide sequences between normal and patients

nt position	Normal	Patient 1	Patient 2	Patient 3
6457 COI	T	C	T	T
8344 tRNA (Lys)	A	G	G	G
11718 ND 4	G	A	G	G
14858 CYTb	G	A	G	A

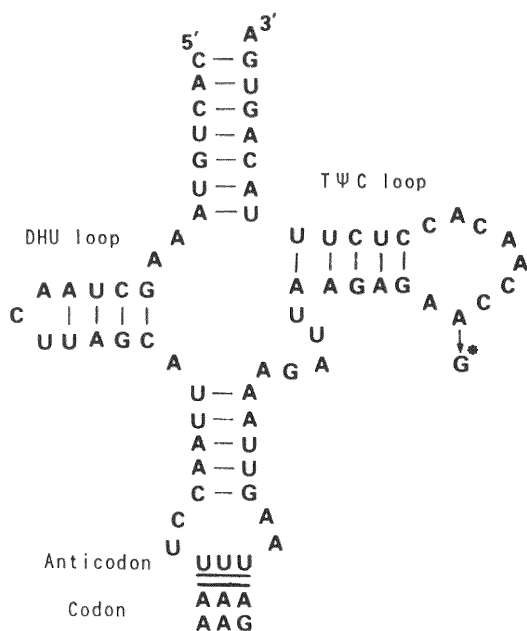


Fig. 4 The secondary structure of tRNA<sup>Lys</sup> of mitochondria.

また、イムノプロットの結果でも一つの複合体中の複数のサブユニットの低下が認められた。これらの現象も tRNA が mtDNA で規定されるすべてのサブユニットの発現に関与していることを考えると説明できる。

以上から tRNA<sup>Lys</sup> 領域のこの塩基置換が最も MERRF の病因として可能性が高いものとしてあがったが<sup>24)</sup>、ここでさらに残された問題として (1) この塩基置換は

はたして MERRF 患者の全てに認められるものであるか。さらに、他のミトコンドリア病の一つである CPEO あるいは KSS においては、正常の mtDNA と変異 (欠失) を持つ mtDNA が混在して存在する heteroplasmy の状態を呈することが知られているが (2) 本症においても mtDNA は heteroplasmy の状態で存在するか否かの二点があげられた。これらの問題点に対して、筆者はさらに独立した3家系5症例を加えて後述するミスマッチプライマーを用いた PCR-RFLP を用いて検討した。初めに、ミスマッチプライマーを用いた PCR-RFLP の原理について説明し、次にその結果について述べる。

Fig. 6 にミスマッチプライマーを用いた PCR-RFLP の原理を示す。この塩基変異は制限酵素 *Cvi* II の認識部位を形成するが、この制限酵素は入手困難であるため、ミスマッチプライマーをもちいた PCR によって、新たな制限酵素認識部位を形成した。図中のプライマーは2箇所のCがミトコンドリアゲノム内の2箇所のAと対応しないが、RCRの結果この2箇所のAが2箇所のGに変化するため MERRFmtDNA の塩基配列においては 5'-GCCGGC-3' の6塩基が制限酵素 *Nae* I の新たな認識部位となり、155 bp と 18 bp の DNA 断片に切断される。一方、正常の mtDNA の塩基配列においては、この部位は *Nae* I によって認識されない。Fig. 7 はこの塩基変異をもつクローン (clone 2) と持たないクローン (clone 1) を鋳型として、このミスマッチプライマーを用いた RCR-RFLP の結果である。変異を持つクローンより増幅した PCR 断片は完全に制限酵素 *Nae* I によって消化され 18 bp 短い DNA 断片として検出される。Fig. 8 は初めに分析した3家系を

	A. A.	D.	D.	D.	A. C.	A. C.	A. C.	V.	T.	T.	T.	A. A.
	STEM	STEM	LOOP	STEM	STEM	LOOP	STEM	LOOP	STEM	LOOP	STEM	STEM
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MERRF	CACTGTAAGCTA-ACT-----TAGCATTAACTTTTAAGTTAAAGATTAAGAGAG	CCCAACAC-CTCTTTACAGTGA										
Human	CACTGTAAGCTA-ACT-----TAGCATTAACTTTTAAGTTAAAGATTAAGAGAG	CCCAACAC-CTCTTTACAGTGA										
Bovine	CACTAAGAAGCTA-TA-----TAGCACTAACCTTTTAAGTTAGAGATTGAGAG--	CCATATA-CTCTCCTTGGTGA										
Mouse	CACTATGAAGCT-AAG-----AGCGTTAACTTTTAAGTTAAAG-TT-AGAG-	ACCTTAAAA-TCTCCATAGTGA										
Rat	CATTGCGAAGCTT-AG-----AGCGTTAACTTTTAAGTTAAAG-TT-AGAG-	AC-AACAA-ATCTCCACAATGA										
Xenopus	CACTAAGAAGCTAAATAGGCATTAGCGACAGCCTTTTAAGCTGTAGATTG-GTG-	ACTCCCAACCAC-CCTTAATGA										
Cod	CACTAAGAAGCTAATATGGGTTAAGCACCAGCCTTTTAAGCTGGAAGCAG-GTG-	ACTCCCAACCAC-CCTTAATGA										

Fig. 5 The tRNA<sup>Lys</sup> nucleotide sequences around the mutation compared with other species<sup>15) 16) 17) 20) 21) 22)</sup>.

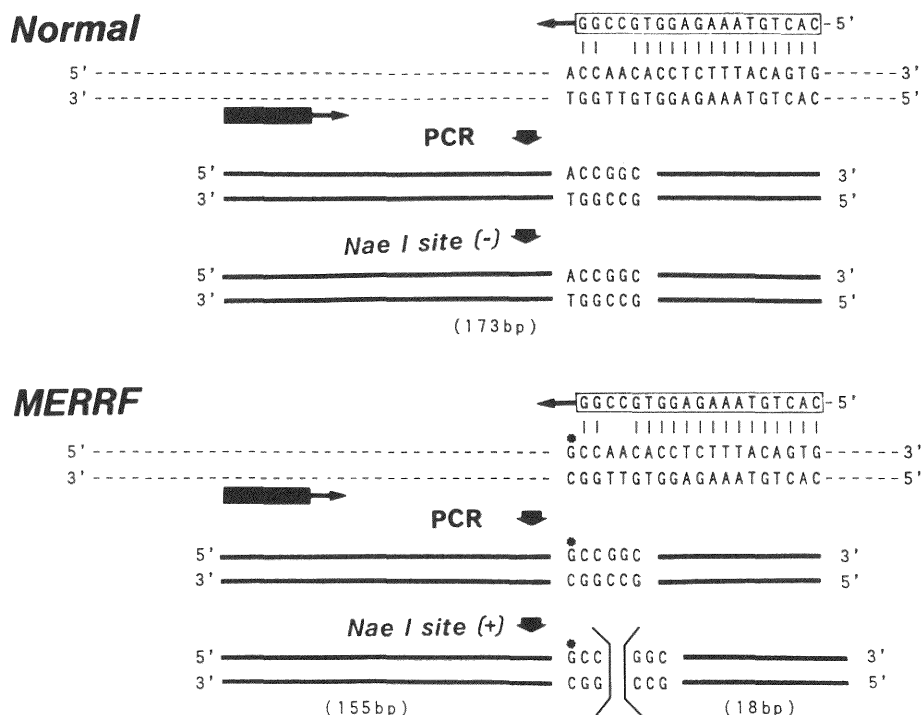


Fig. 6 Nae I RFLP of PCR products with a mismatch primer.

Two A residues in mitochondrial genome are mismatch with a primer. After PCR reaction, the two A residues change to two G residues, as the result, 6 nucleotides are recongnized by Nae I in MERRF. This site is not cleaved by the enzyme in normal mitochondrial sequence.

含む6家系、8名の MERRF 患者の分析結果である。症例2で剖検脳を用いた以外は生検骨格筋を分析対象とした。全ての症例において tRNA<sup>Lys</sup> の塩基変異が共通に認められた。症例1及び3において PCR 増幅 DNA 断片の移動度が大きいのは、正常のアジア人の16%に塩基番号 8272 から始まる 9bp の欠失が正常多型として存在するためである<sup>25)</sup>。さらに注目すべきは、非常にごく少量であるが、Nae I 消化後も正常の塩基配列に由来する PCR 増幅断片が存在することである。この断片はさらにもう一度 Nae I で消化後も存在し、部分消化によって生じたものではなく、mtDNA が heteroplasmy の状態で存在することを示すものである。

最近、Shoffner らによって MERRF 患者に同一の塩基変異が見いだされ、2~27%の割合で正常の塩基配列に由来するのクローンが存在すると報告された<sup>26)</sup>。

さらに、彼らは発症年齢と heteroplasmy の程度に相関がみられると報告している。しかしながら、我々の結果では発症年齢や重症度に差があるどの症例についても正常の塩基配列を持つクローンの割合はごく低く、特に発症年齢や重症度との関連は明らかではなかった。heteroplasmy の程度のみならず、他の因子の関与が MERRF の病態の解釈には必要と思われる。

CPEO においては、変異をもつ mtDNA は末梢血では検出されないが、本症において Fig. 9 に示すように、白血球 mtDNA においても同一の塩基変異を持つクローンが検出され、白血球による本症の遺伝子診断が可能であることを示しており、臨床の場において筋生検によらないで末梢血による遺伝子診断ができる意義は大きいと考える。

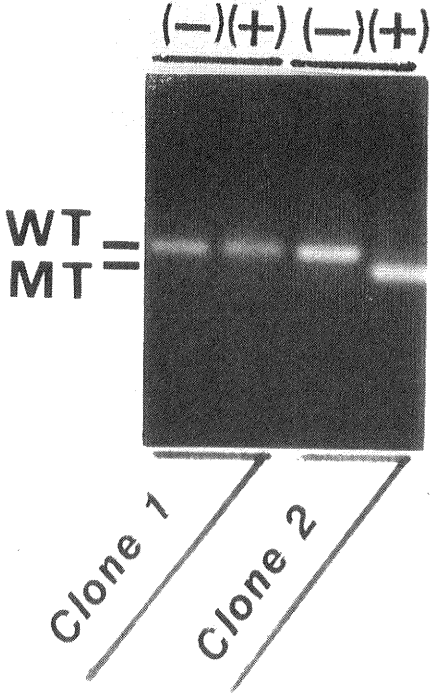


Fig. 7 PCR-RFLP with a mismatch primer using cloned wild type (clone 1) and mutant (clone 2) sequences. PCR fragment derived from mutant sequence is completely digested by *Nae* I.

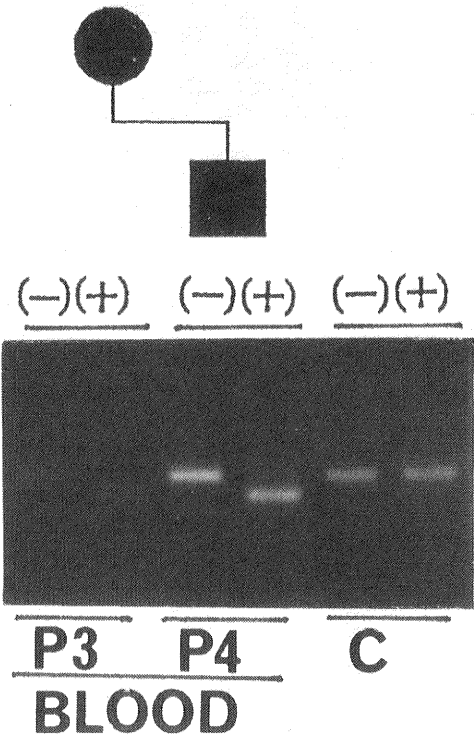


Fig. 9 *Nae* I RFLP of PCR with a mismatch primer in leucocytes from the patients 3 and 4.

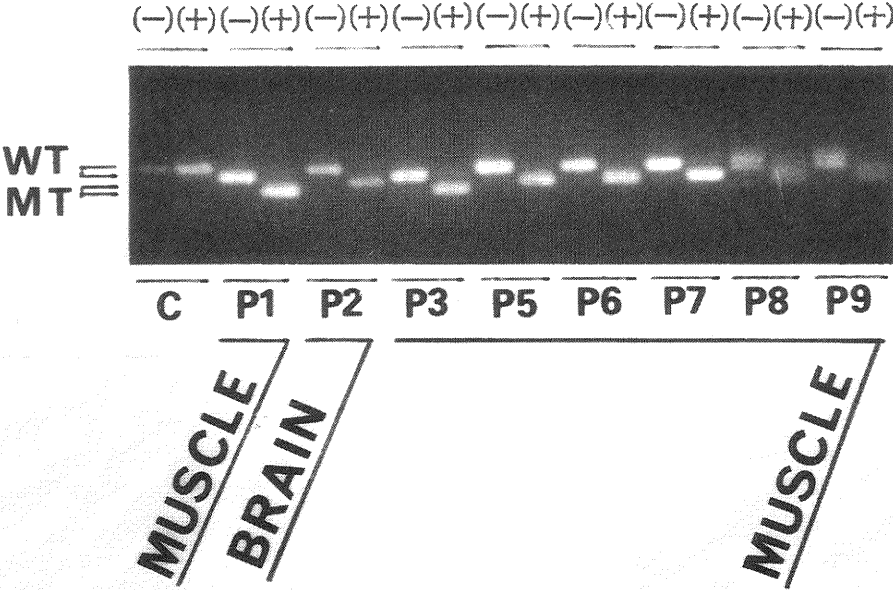


Fig. 8 *Nae* I RFLP of PCR products with a mismatch primer, in a control and 8 patients from 6 independent MERRF families.

### III. 結 語

1. MERRF 患者の mtDNA の解析から, tRNA<sup>Lys</sup> 塩基番号 8344 の A から G への塩基変異が共通に認められた。

2. ミスマッチ プライマーを用いた PCR-RFLP によって簡便に末血による遺伝子診断が可能である。

3. この塩基変異は独立した 6 家系 9 名の MERRF 患者の全てに認められた。

今後は, この塩基変異によって tRNA<sup>Lys</sup> の高次構造や機能にどのような影響を及ぼし, ミトコンドリアの蛋白発現にどう影響しているのかを解明し, 各臓器での発現, 臨床徴候を説明していくことが必要であると考ええる。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました宮武正教授に心から感謝の意を表します。また直接の御指導を頂きました辻省次助手, 名古屋大学第二生化学 小沢高将教授, 田中雅嗣先生, 国立遺伝学研究所人類遺伝学部門 宝来聰先生に深謝致します。丹野芳範先生および諸橋イネ子嬢の御協力に深謝致します。更に, 貴重な患者資料を御提供頂きました新潟大学脳研究所実験神経病理学部門 生田房弘教授, 大浜栄作助教授, 国立精神神経センター微細構造部門 埜中征哉部長, 国立療養所犀潟病院神経内科 福原信義先生, 佐渡総合病院神経内科 本間義章先生, 長岡中央総合病院神経内科 長嶋勝先生に深謝致します。なお, 本研究の概要は International Symposium, Mitochondrial Myopathies on the XIth International Congress of Neuro-pathology において発表した。

### 参 考 文 献

- 1) DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., Nakagawa, M. and DeVivo, D.C.: Mitochondrial myopathies. *Ann. Neurol.*, **17**: 521~538, 1985.
- 2) Pavlakis, S.G., Phillips, P.C., DiMauro, S., DeVivo, D.C. and Rowland, L.P.: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS): a distinctive clinical syndrome. *Ann. Neurol.*, **16**: 481~488, 1984.
- 3) Nikoskelainen, E., Hassinen, I.E., Palajarvi, L., Lang, H. and Kalimo, H.: Leber's hereditary optic neuropathy, a mitochondrial disease?. *Lancet*, **ii**: 1474, 1984.
- 4) Fukuhara, N., Tokiguchi, S., Shirakawa, S. and Tsubaki, T.: Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): disease entity or syndrome? Light and electro-microscopic studies of two cases and review of the literature. *J. Neurol. Sci.*, **47**: 117~133, 1980.
- 5) Holt, I.J., Harding, A.E. and J.M., Morgan-Hughes: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, **331**: 717~719, 1988.
- 6) Ozawa, T., Yoneda, M., Tanaka, M., Ohno, K., Sato, W., Suzuki, H., Nishikimi, M., Yamamoto, M., Nonaka, I. and Horai, S.: Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in family with mitochondrial myopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**: 1240~1247, 1988.
- 7) Horai, S., Gojobori, T. and Matsunaga, E.: Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese. I. Analysis with restriction enzymes of six base pair recognition. *Hum. Genet.*, **68**: 324~332, 1984.
- 8) Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hogde, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M.S., Elsas II, L.J. and Nikoskelainen, E.K.: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, **242**, 1427~1430, 1988.
- 9) Yoneda, M., Tsuji, S., Yamauchi, T., Inuzuka, T., Miyatake, T., Horai, S. and Ozawa, T.: Mitochondrial DNA mutation in family with Leber's hereditary optic neuropathy. *Lancet*, **i**: 1076~1077, 1989.
- 10) Gyllenstein, U.: Direct sequencing of *in vitro* amplified DNA.: PCR technology: 45~60. 1989 Stockton Press, New York.
- 11) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors by dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463~5467, 1977.
- 12) Chen, E.Y. and Seeburg: Supercoil sequencing: A fast and simple methods for sequencing plasmid DNA. *DNA*, **4**: 165~170, 1985.
- 13) Bookelman, H., Trijbels, J.M.F., Sengers, R.C.A. and Jassen, A.J.M.: Measurement of cytochromes in human skeletal muscle mitochondria,

- isolated from fresh and frozen stored muscle specimens. *Biochem. Med.*, **19**: 366~373, 1978.
- 14) Yoneda, M., Tanaka, M., Nishikimi, M., Suzuki, H., Tanaka, K., Nishizawa, M., Atsumi, T., Ohama, E., Horai, S., Ikuta, F., Miyatake, T. and Ozawa, T.: Pleiotropic molecular defects in energy-transducing complexes in mitochondrial encephalomyopathy. *J. Neurol. Sci.*, **92**: 143~158, 1989.
- 15) Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreire, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. and Young, I.G.: Sequence and Organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**: 457~465, 1981.
- 16) Anderson, S., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F. and Young, I.G.: Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.*, **156**: 683~717, 1982.
- 17) Bibb, M., Van Etten, R., Wright, C.T., Walberg, M.W. and Clayton, D.A.: Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, **26**: 167~180, 1981.
- 18) Horai, S. and Hayasaka, K.: Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.*, **46**: 828~842, 1990.
- 19) Zennaro, E., Francisci, S., Ragnini, A., Frontali, L. and Fukuhara, B.: A point mutation in a mitochondrial tRNA gene abolishes its 3' end and processing. *Nucl. Acid Res.*, **17**: 5751~5764, 1989.
- 20) Gadalata, G., Pepe, G., De Candia, G., Quagliariello, C., Sbisa, E. and Saccone, C.: The complete nucleotide sequence of the *Rattus norvegicus* mitochondrial genome: Cryptic signals revealed by comparative analysis between Vertebrates. *J. Mol. Evol.*, **28**: 497~516, 1989.
- 21) Roe, B.A., Ma, D., Wilson, R.K. and Wong, J.F.H.: The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.*, **260**: 9759~9774, 1985.
- 22) Johansen, S., Guddal, P.H. and Johansen, T.: Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucl. Acids Res.*, **18**: 411~419, 1990.
- 23) Wallace, D.C., Zheng, X., Lott, M., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R.I., Epstein, C.M. and Hopkins, L.C.: Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): Genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell*, **55**: 601~610, 1988.
- 24) Yoneda, M., Tanno, Y., Horai, S., Ozawa, T., Miyatake, T. and Tsuji, S.: A common mitochondrial DNA mutation in the tRNA<sup>Lys</sup> of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. *Biochem. Int.*, **21**: 789~796, 1990.
- 25) Horai, S.: Molecular phylogeny and evolution of human mitochondrial DNA.: New aspects of the genetics of molecular evolution, Springer-Verlag (in press).
- 26) Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M.S., Seibel, P., Ballinger, S.W. and Wallace, D.C.: Myoclonus epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> mutation. *Cell*, **61**: 931~937, 1990.

(平成2年9月17日受付)