



Title	Kearns-Sayre 症候群におけるミトコンドリアDNAの解析
Author(s)	曾我, 文久
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37535">https://hdl.handle.net/11094/37535</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	曾	我	文	久
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9595	号	
学位授与の日付	平成3年3月14日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	Kearns-Sayre症候群におけるミトコンドリアDNAの解析			
論文審査委員	(主査) 教授 垂井清一郎			
	(副査) 教授 田川 邦夫 教授 西村 健			

### 論文内容の要旨

#### (目的)

Kearns-Sayre症候群は進行性外眼筋麻痺、網膜色素変性、心伝導障害を三主徴とするミトコンドリア脳筋症の一型であり、骨格筋ミトコンドリア形態異常、好気的運動時の高乳酸血症、乳酸／ピルビン酸比の異常高値などの特徴的所見を示し、ミトコンドリア内膜電子伝達系機能の障害が指摘されていた。ところが本症生検骨格筋のミトコンドリア内膜電子伝達系酵素活性については正常例、異常例が存在し、一定の見解が得られておらず、遺伝子レベルでの解析が必要と考えられた。ミトコンドリア内膜電子伝達系を構成する酵素複合体の構成蛋白13個の遺伝子および22個のtRNA遺伝子、2個のrRNA遺伝子はミトコンドリアDNA (mtDNA) 上に連続して存在し、核ゲノムDNAとは異なり介在配列はない。したがって mtDNAの塩基配列の異常はただちに酵素蛋白の合成障害をきたし、ミトコンドリア内のエネルギー産生の障害をきたすと考えられる。

そこで本研究では、Kearns-Sayre症候群の電子伝達系酵素活性低下を示した酵素のサブユニットをコードする mtDNA遺伝子異常の有無について検索した。つぎに異常 mtDNAの塩基配列を決定し、その異常がどのような特異配列の関与により生ずるかを分析し、臨床症状との対比をあわせて行うことにより本症の発症機構を明らかにすることを目的とした。

#### (方法)

Kearns-Sayre症候群7例を対象とした。進行性外眼筋麻痺、網膜変性、生検骨格筋のragged-red fibers、好気的運動時高乳酸血症が全例で認められた。5例で四肢筋筋力は低下し、そのうち2例には筋萎縮を伴う高度な筋力低下が見られた。

### (1) 骨格 mtDNA の Southern blot 解析

生検骨格筋約50mgから約50μgの総DNAを抽出し、制限酵素 (BamHI, EcoRI, PstI) で消化後、ヒト胎盤組織から分離精製した正常 mtDNA をプローブとして Southern blot 解析を行った。この結果から各症例における mtDNA 部分欠失の同定、mtDNA 総数に占める異常 mtDNA 比率の定量を行った。

### (2) mtDNA 欠失断端塩基配列の決定

Southern blot 解析により同定された欠失領域の約200bp 外側に、5' 側では L鎖配列、3' 側では H鎖配列をもつオリゴヌクレオチドを合成し、総DNA 100ng から欠失断端を含む領域を polymerase chain reaction 法で増幅した。このDNA断片を M13 ファージに組み込み、ジデオキシン酵素法で欠失断端の塩基配列を決定した。

#### (成 績)

(1) 高度な筋力低下を有する 2 例では骨格筋電子伝達系酵素活性は低下しており、その活性低下に一致した複合体蛋白遺伝子の欠失が見いだされた。1 例では複合体 I + III 活性は対照の 7%，II + III 活性は 44% に低下しており、mtDNA 総数の 53% に複合体 I の NADH dehydrogenase subunit 5, 6 (ND 5, 6)，および複合体 III の cytochrome b 遺伝子領域にまたがる 3.4kb の欠失があった。他の 1 例では複合体 I + III 活性は 43%，複合体 IV 活性は 1% 以下であり、mtDNA 総数の 80% で複合体 I の ND 3, 4, 5, 6，および複合体 IV の cytochrome c oxidase subunit 3 遺伝子領域にまたがる 5.5kb の欠失があった。電子伝達系酵素活性は正常であるが筋力低下を有する 3 例においてもそれぞれ mtDNA の 57% に 5.6kb の欠失、37% に 9.2kb の欠失、および 47% に 5.0kb の欠失が存在した。

(2) mtDNA の H鎖と L鎖の複製開始点の中央部に位置する約 5 kb の欠失を有する 3 症例の mtDNA 欠失断端には 5, 10, 13 塩基の反復配列 (CCCAC, ACCGCTAAC, ACCTCCCT, CACCA) が見いだされ、欠失領域が複製開始点に近接していた 2 症例の欠失断端には反復配列はなかった。

#### (総 括)

- 筋症状を有する Kearns-Sayre 症候群症例で骨格筋 mtDNA 欠失が見られ、さらに欠失した遺伝子領域に対応する電子伝達系複合体活性が低下した症例が存在した。これは mtDNA の遺伝子レベルでの異常が筋細胞でのエネルギー産生低下を招き、筋症状の発現にいたったと考えられる。
- 断端に反復配列 (direct repeat) を有する mtDNA 欠失は H鎖、L鎖複製開始点間の中央領域に証明された。この領域は mtDNA の非対称な複製過程で数 kb におよぶ一本鎖DNAとなる。この一本鎖DNAに存在する反復配列間での組換えが起り大欠失が生じると考えられた。一方、複製開始点に近接する領域に起る欠失では反復配列が関与しないことを示す症例を認めた。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は Kearns-Sayre 症候群における細胞内エネルギー産生障害の機序を解析する目的で骨格筋のミトコンドリア遺伝子の異常を検討したものである。

その結果、骨格筋ミトコンドリアDNAに種々の部分欠失を見いだし、欠失した遺伝子に対応する電子伝達系複合体の活性が低下した症例の存在を明らかにした。塩基配列解析により欠失断端に欠失機序に関与する3種の特異配列(direct repeat)を見いだし、このうち2種は本研究により初めて見いだされた断端特異配列であった。さらにミトコンドリアDNAの欠失にはdirect repeatを介する機序以外の成因も関与することを明らかにした。本研究はミトコンドリア遺伝子異常の成因と臨床的意義について新知見を提供し、Kearns-Sayre症候群の発症機構の解明に貢献するものである。以上より本研究は学位に値すると考える。