

PCR法によるミトコンドリアDNA点異変の検出 ——乾燥濾紙血液および尿沈渣を用いる MELAS/MERRFのハイリスク・スクリーニング——

山口 昭弘 福士 勝 清水 良夫 菊地由生子
北川まゆみ*1 楠 祐一*2

要 旨

乾燥濾紙血液(濾紙血)および尿沈渣を試料として、ミトコンドリア脳筋症; MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes) および MERRF (Myoclonus Epilepsy and Ragged-Red Fibers) におけるミトコンドリア DNA (mtDNA) の点異変を、PCR (Polymerase Chain Reaction) 一制限酵素処理により検出する方法を検討した。DNA の抽出は、濾紙血は有機溶媒による色素固定-ボイル処理で十分であったが、尿沈渣はプロテインナーゼK処理/フェノール抽出を必要とした。MELAS 患者3例および MERRF 患者1例の変異 mtDNA は濾紙血 (63-83%) および尿沈渣 (82-94%) といずれの試料においても検出可能であった。

1. 緒 言

ミトコンドリア脳筋症は、ミトコンドリアのエネルギー産生系の障害によって引き起こされる疾患で、骨格筋、中枢神経を中心とした全身症状を呈する。典型的には、筋力低下、易疲労性、低身長などが見られるものの、発症時期、障害の程度、範囲などにはかなりの多様性が認められる。従来、臨床的には大きく三つの症候群に分類されてきたが、近年、各症候群に対応する mtDNA の異常として遺伝子レベルでの解明が進められている¹⁾。進行性外眼筋麻痺を伴う KSS (Kearns Sayre Syndrome) は 1-7 Kbp の欠失が²⁾、てんかん様発作を伴う MELAS は tRNA^{Leu(UUR)} の A → G (3, 243) 点変異が³⁾、不随意運動を伴う MERRF は tRNA^{Lys} の A → G (8, 344) 点変異が⁴⁾ それぞれの病因であることが明かとされている。このうち MELAS, MERRF の点変異は、患者の全てではないが、大部分 (80%以上) の症例に共通した変異である。また、変異 mtDNA は正常 mtDNA と混在しており (ヘテロプラズミー)、通常、変異 mtDNA 量が多いほど重症と考えられている。最近では、臨床症状の出現時期と変異 mtDNA の各組織における割合、あるいは加齢に伴う変異率の変動との関係などが注目されている。

一方、点変異 DNA の検出方法についても、MELAS

変異は Goto ら³⁾ により、MERRF 変異は Zeviani ら⁵⁾ により、PCR と制限酵素処理を組合わせた簡便な方法が開発されている。

我々は、DNA 源として試料採取・取り扱いの容易な濾紙血および尿沈渣を用いて MELAS および MERRF 変異の検出を試み、筋肉試料との変異率の比較を行なった。さらに、これらの結果から、スクリーニングへの応用面についても検討を加えた。

2. 方 法

2-1 対象および試料

MELAS 3 家系 7 人、MERRF 1 家系 5 人から得られた濾紙血、尿沈渣および生検筋あるいは筋スライド切片を用いた。

2-2 試薬および操作

1) DNA の抽出

濾紙血: 3 mm 径ディスク 1 枚を 0.5 ml エッペンチューブにパンチし、有機溶媒 (methanol: acetone: H₂O = 35: 35: 10) 10 μl を加え、37°C で 30 分乾燥する (色素固定)。再蒸留水 60 μl を加え、95°C で 15 分ボイルし、15,000 rpm, 5 分遠沈後の上清 10 μl を PCR に用いた。

尿沈渣: 約 10 ml の尿から 3,000 rpm, 5 分の遠沈

*1 北海道大学医学部神経内科 *2 旭川医科大学小児科

により集めた沈渣を TEN 緩衝液 (10 mM Tris-1 mM EDTA-10 mM NaCl, pH 8.0) で洗浄後 (5 ml×2), 常法に従いプロテイナーゼ K/フェノール抽出を行う。最終的に, TE 緩衝液 (10 mM Tris, pH 8.0-1 mM EDTA) 200 μ l に溶解し, このうち 10 μ l を PCR に用いた。

骨格筋・生検筋 (約 100 mg) あるいは筋スライド切片をホモジナイズ後, プロテイナーゼ K/フェノール抽出を行ない, TE 緩衝液 200 μ l に溶解した。PCR にはこのうち 10 μ l を用いた。

2) プライマー

プライマーは文献に準じ^{3,5)}, MELAS 変異の検出には ME-1: 5'-AGG ACA AGA GAA ATA AGG CC, ME-2: 5'-CAC GTT GGG GCC TTT GCG TA を, MERRF 変異の検出には MR-1: 5'-CTA CCC CCT CTA GAG CCC AC, MR-2: 5'-GTA GTA TTT AGT TGG GGG ATT TCA CTG TAA AGC CGT GTT GG を, CYCLONE Plus DNA 合成装置 (Milligen/Biosearch, U S A) により得られたものを用いた。

3) PCR 条件

Taq DNA ポリメラーゼ 2.5 U (和光純薬製を添付の X 10 緩衝液とともに), 4 種の dNTP 各 10 nmole, プライマー各 50 pmole を含む PCR 反応液 40 μ l を DNA 抽出液 10 μ l に加え, ミネラルオイル一滴を表面

に積層する。温度コントロールシステム (Astec 製 PC-700 型) を用いて, DNA の変性/アニーリング/伸張温度=95°C/55°C/72°C の各ステップを 30 サイクル行い, 目的 DNA 領域を増幅する。

4) 制限酵素処理

PCR により増幅された DNA 溶液 10 μ l と酵素液 (TOYOBO 製, 10 U の酵素と添付の緩衝液を含む) 10 μ l を混合し, 37°C で 1 時間酵素反応を行う。MELAS 変異の存在は Apa I の (294 bp \rightarrow 182 bp+112 bp), MERRF 変異の存在は Bgl I の (108 bp \rightarrow 73 bp+35 bp) 切断部位を生じる。

5) 変異 DNA の検出および定量

制限酵素処理後の DNA フラグメントをアガロースミニゲル電気泳動 (コスモバイオ製) により分離後, エチジウムブロマイド染色により検出した。変異 DNA の割合は, ポラロイド写真上の各バンドをデンストメトリー (島津 CS-920 型) により測定し, 塩基数で補正した変異/正常バンドの強度比から求めた。

3. 結 果

濾紙血からの DNA 抽出は, 血色素固定-ボイル処理のみで十分であり, プロテイナーゼ K/フェノール抽出を行った場合よりも, むしろ強い目的バンドの増幅が認められた。一方, 尿沈渣については, ボイル処理のみでは, PCR による増幅は認められず, プロテ

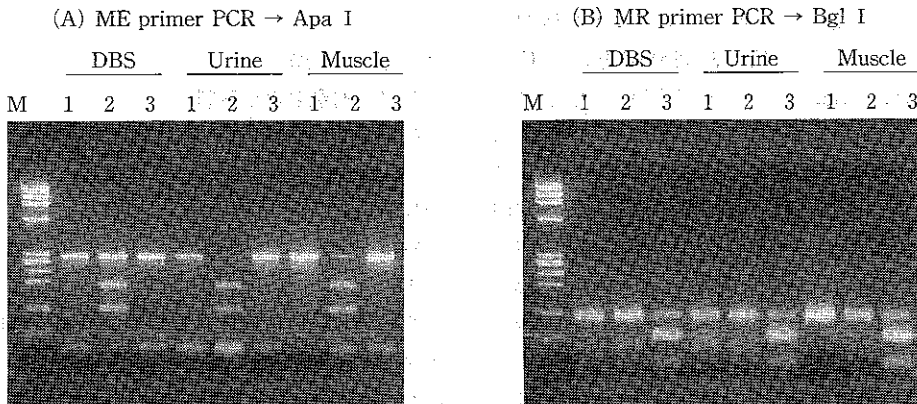


Fig. 1 PCR amplifications followed by digestions with Apa I for MELAS (A) and Bgl I for MERRF (B)

M: size marker ($\lambda\phi$ /Hind III) DBS : dried blood spots
 1: normal control (TAN) Urine : urine sediments
 2: MELAS patient (TAN) Muscle: skeletal muscle
 3: MERRF Patient (NAR)

Table 1 Percentage of mutant mtDNA (3,243 A → G) in MELAS families

Family	Mutant mtDNA (%)		
	Dried blood spots	Urine sediments	Skeletal muscle
1 (TAN)			
Patient (10Y, F)	63	92	89
Mother	<10	22	**
Sister (elder)	20	27	**
2 (HID)			
Patient (19Y, F)	**	88	89
3 (KUB)			
Patient (21Y, M)	68	94	84
Mother	**	**	<10
Father	<10	**	**

** not tested

Table 2 Percentage of mutant mtDNA (8,344 A → G) in MERRF family

Family	Mutant mtDNA (%)		
	Dried blood spots	Urine sediments	Skeletal muscle
1 (NAR)			
Patient (15Y, F)	82	85	86
Mother	<10	**	**
Father	<10	**	**
Sister (elder)	<10	**	<10
Niece	<10	**	**

** not tested

ナーゼK/フェノール抽出を必要とした (Fig 1)。

MELAS および MERRF 患者の変異 mtDNA の割合は、MELAS 3 例では濾紙血 63-68%、尿沈渣 88-94%、骨格筋 84-89% であり (Table 1)、MERRF 1 例では濾紙血 82%、尿沈渣 85%、骨格筋 86% であった (Table 2)。また、患者家系内で臨床症状が認められない両親、同胞例などを検索した結果、MELAS の家系 2 において母と姉に変異が認められた。母の変異は尿沈渣で 22% であるが、濾紙血では認められなかった (<10%) のに対し、姉は尿沈渣で 27%、濾紙血でも 20% と変異が認められた。その他の家系においては、少なくとも 10% 以上の変異は検出されなかった (Table 1, 2)。これらの結果から、患者における変異 DNA の割合は、以前から言われているように血液に比べて骨格筋ではやや高いこと、さらに今回はじめて、尿

沈渣は骨格筋と同程度の値を示すことが明かとなった。

4. 考 察

DNA 源としての濾紙血の有用性は、早くから知られており、先天性代謝異常症の診断あるいはスクリーニングへの実際応用としては、筋ジストロフィー症⁶⁾、中鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症⁷⁾ など、既にいくつかの報告がなされている。今回、我々は Jinks ら⁸⁾ による血色素固定-ボイル処理を一部改良した、より簡便・迅速な濾紙血 DNA の抽出法を用い、PCR と制限酵素による mtDNA の MELAS, MERRF 点変異の検出を試み、良好な結果が得られた (Fig 1)。濾紙血を用いることにより、試料の採取・収集および保存が容易となり、DNA 抽出操作も簡便なことから、多数検体の処理を必要とするスクリーニングへの応用が可能となる。また、全国レベルで実施されている新生児先天性代謝異常症等のマス・スクリーニング時の保存濾紙血を用いて、MELAS, MERRF 患者の新生時期の変異 DNA の割合を知ることも可能であろう。

一方、尿沈渣を用いた DNA 診断の実際例の報告は、これまで見当たらないが、DNA の抽出はボイル処理のみでは細胞成分以外の沈渣成分により PCR が妨害を受けるため、前処理としてプロテイナーゼ K/フェノール抽出を必要とした。尿沈渣を DNA 源とする必要性は一般的にはそれほど高くはないであろうが、MELAS, MERRF に関しては、病態との深い関連を有する変異 mtDNA の割合が組織間で異なることが示唆されていることから、尿沈渣も重要な意味を持つことになる。MELAS に関するこれまでの報告、または我々の患者試料の測定結果 (Table 1) から、血液細胞は骨格筋に比べ変異 mtDNA の割合が低いのに対し、今回、例数は少ないものの尿沈渣では骨格筋と同程度の変異率を示すことが明かとなった。実際、MELAS の家系 1 (TAN) の母親の場合、尿沈渣では 22% の変異が認められているが、濾紙血 (血液細胞) においては検出されていない (<10%)。骨格筋の変異 mtDNA の割合を推定する上で、筋生検に代わって、試料採取の容易な尿沈渣は有用な DNA 源と考えられ、家族検索への応用が期待できる。

一方、MERRF 患者の変異 mtDNA 割合は、濾紙血、尿沈渣および骨格筋いずれも 80% 強と大差なく (Table 2)、MELAS とは異なる傾向を示した。このこ

とは、MELASが重度の高乳酸血症を伴い、腎尿細管の障害を伴う場合が多いことを考え合わせると非常に興味深い。

ミトコンドリアは母性遺伝を示し、mtDNA病は常染色体性優性あるいは劣性遺伝形式を取ることが知られている。また、mtDNAに比べ進化の速度が十倍早いと言われ、それだけ突然変異を生じる確率が高くなる。MELAS、MERRFの場合も多くは孤発例とされており、MELAS患者3 (Table. 1) およびMERRF患者1 (Table. 2) は母親に変異が検出されていないことから孤発例と考えられる。ただ、最近、Satoら⁹⁾により、母娘へと世代を重ねることにより、僅かな変異が増幅されてくる可能性が示唆されており、ここで述べた症例もドットプロテイングなどにより、変異mtDNAの検出感度を上げて検討する必要がある。

5. 結 語

濾紙血および尿沈渣を試料としてMELAS、MERRFにおけるmtDNA点変異の検出が可能となった。これにより、ハイリスク集団に対するスクリー

ニングへの実際応用が期待でき、さらに尿沈渣細胞の変異mtDNAの割合は骨格筋と同程度であることから、家族検索における採取の容易な試料として有用と考えられる。

6. 文 献

- 1) 太田成男・実験医学, **9**(10), 1174-1177, 1991.
- 2) Holt I J, et al: Nature, **331**, 717-719, 1988.
- 3) Goto Y, et al: Nature, **348**, 651-653, 1990.
- 4) Shoffner J. M., et al: Cell, **61**, 931-937, 1990.
- 5) Zeviani M, et al: Am. J. Hum. Genet., **48**, 203-211, 1991.
- 6) Thomas W. P., et al: Clin. Chem., **36**, 1756-1759, 1990.
- 7) Gregersen N, et al: Clin. Chim. Acta, **203**, 23-24, 1991.
- 8) Jinks D.C., et al: Hum. Genet., **81**, 363-366, 1989.
- 9) Sato W., et al: Am. J. Hum. Genet., **50**, 655-657, 1992.

RCR Detection of Point Mutations in Mitochondrial DNA : Its Application to Screening for MELAS and MERRF Using Dried Blood Spots or Urine Sediments

Akihiro Yamaguchi, Masaru Fukushi, Yoshio Shimizu, Yuko Kikuchi,
Mayumi Kitagawa*¹ and Yuichi Kusunoki*²

ABSTRACT

DNA samples extracted from dried blood spots or urine sediments were applied to a PCR-endonuclease detection of point mutations of mitochondrial DNA (mtDNA) in MELAS and MERRF patients. A simple procedure with hemoglobin denaturation/boiling treatment was suitable for dried blood spots, although the complete procedure with proteinase K digestion/phenol extraction was required for urine sediments. The mutant mtDNA of three MELAS and one MERRF patients were successfully detected in the range of 63-82% for dried blood spots and 82-94% for urine sediments. The easiness of sampling or DNA preparation using these new DNA-sources enables to have a screening program for the genetic defects.

*¹ Department of Neurology, Hokkaido University School of Medicine

*² Department of Pediatrics, Asahikawa Medical College