

## 論文の内容の要旨

論文題目 ミトコンドリア病の診断における呼吸鎖複合体 V の生化学的評価

氏名 内野 俊平

【序文】ミトコンドリアは生体の主要なエネルギーである ATP を産生する重要な細胞内小器官である。ATP 合成の場となる呼吸鎖複合体は、ミトコンドリア内膜上に存在するタンパク複合体で、電子を伝達しながら膜の内外にプロトン勾配を形成する電子伝達系（複合体 I~IV）と、そのプロトン勾配を利用して ATP 合成を行う ATP 合成酵素（複合体 V）から構成される。ミトコンドリア病は、ミトコンドリアの何らかの機能異常により、神経や筋を中心とした多臓器に多様な症状をきたす疾患群である。ミトコンドリア病の原因は様々だが、中でも呼吸鎖複合体の異常によるものが最多である。したがってミトコンドリア病の診断のためには遺伝学的解析、筋病理診断等と並んで、呼吸鎖複合体の生化学的評価が重要である。呼吸鎖複合体の評価としては、酵素として働く各複合体の酵素活性測定や、Blue native PAGE (BN-PAGE) を用いた複合体の量・構造の評価などが行われる。BN-PAGE とは、タンパクを変性させずに電気泳動を行う native-PAGE の手法の 1 つであり、検体を色素で処理することにより、複合体構造を保ったままのタンパクを大きさに応じて負に荷電させて泳動・分離できるため、特に呼吸鎖複合体のような膜タンパクの評価に適した方法である。

呼吸鎖複合体 V 欠損症は複合体 V (F1-F<sub>0</sub> ATP 合成酵素) の異常による疾患で、呼吸鎖複合体の異常の中では比較的まれである。特徴的な症候群を呈する症例もあるが、臨床症状は非特異的かつ多彩である。複合体 V を構成する多数のサブユニットはミトコンドリア DNA (mtDNA)、核 DNA の双方にコードされているが、複合体 V 欠損症の原因としては mtDNA 上の *MT-ATP6* および *MT-ATP8* の変異によるものが大多数を占める。

複合体 V の酵素活性測定は技術的な困難もあり確立しておらず、呼吸鎖複合体の酵素活性測定の対象は複合体 I から IV までに限られることが多い。また診断の際に呼吸鎖複合体の BN-PAGE まで施行されることは一般的でない。このためミトコンドリア病を疑った場合にも複合体 V について評価されることは稀であり、複合体 V 欠損症の一部は診断に至らず、病態の解明が不十分となっている可能性がある。

【目的】本研究の目的は、呼吸鎖複合体 V 欠損症例を適切に診断するために、BN-PAGE と酵素活性測定により複合体 V の異常を検出できるか検討することと、これらの解析を通して複合体 V 欠損症の病態を解明することである。

【方法】1999 年から 2015 年の期間にミトコンドリア病等の疑いのために筋生検がなさ

れ、国立精神・神経医療研究センターに骨格筋検体が送付された症例のうち、mtDNA 解析にて *MT-ATP6* あるいは *MT-ATP8* に変異またはバリエントが同定され、なおかつ培養細胞が利用可能であった 17 症例を対象とした。これらの患者由来筋芽細胞・皮膚線維芽細胞および凍結筋組織から抽出したミトコンドリア分画を用いて、呼吸鎖複合体の BN-PAGE と酵素活性測定を行った。複合体 V の酵素活性として ATP 合成反応を直接測定するためには、新鮮骨格筋を試料としてミトコンドリア内膜が維持された状態で測定する必要があり技術的に困難なため、本研究では逆反応である ATP 加水分解の活性を測定した。本症の原因として最も多い m.8993T>G/C 変異を有する 6 症例についてはパイロシーケンスにより mtDNA の変異率測定を行った。

【結果】 症例は 17 例で、男 8 例、女 9 例であった。小児期の発症が多く、ほとんどは 2 歳以前に発症していた。臨床診断は Leigh 脳症、ミトコンドリアミオパチー、失調、慢性進行性外眼筋麻痺であり、神経筋症状が主症状であったが、そのほかの多臓器に合併症を有する例が多かった。mtDNA の変異の内訳は、*MT-ATP6* 上の変異が 15 例

(m.8950G>A (1 例)、m.8969G>A (1 例)、m.8993T>G (4 例)、m.8993T>C (2 例)、m.9035T>C (1 例)、m.9139G>A (1 例)、m.9155A>G (2 例)、m.9173T>C (1 例)、m.9176T>C (1 例)、m.9185T>C (1 例))、*MT-ATP6/8* オーバーラップ領域の変異が 2 例 (m.8528T>C (1 例)、m.8529G>A (1 例)) であり、このうち病原性が確立している変異が 7 種類 (11 例)、報告はあるが病原性未確定のバリエントが 3 種類 (3 例)、未報告のバリエントが 2 種類 (3 例) であった。

BN-PAGE では、筋芽細胞ミトコンドリアを用いた場合は 17 例中 4 例、骨格筋ミトコンドリアを用いた場合は 17 例中 11 例で、完全型複合体 V (holocomplex) の減少や、分子量の小さい異常な subcomplex を検出した。holocomplex と subcomplex の比率は症例により不定であった。一部の症例では皮膚線維芽細胞についても解析し、筋芽細胞と同様の結果を得た。m.8993T>G/C 変異例での変異率は、筋芽細胞で 54~100%、骨格筋で 76~100%であった。

ATP 加水分解活性測定では、筋芽細胞でも骨格筋でも有意な活性低下を示した例はなかった。

【考察】 臨床像は多彩であり、ミトコンドリア病に矛盾しないものであったが、症状や検査所見のみで複合体 V 異常を想定することは困難であった。BN-PAGE では複合体 V について 3 種類の subcomplex を検出し、各 subcomplex の分子量は過去に報告されているアセンブリ中間体 (F1、F1+Inhibitory factor 1 (IF1)、F1+IF1+c-ring) に合致した。検出率は培養細胞よりも凍結筋ミトコンドリアを用いた場合に高く、病原性が確立している変異を有する症例に限れば、ほぼ全例で subcomplex の異常を検出した。一方で、病原性が否定的なバリエントを有する症例では subcomplex は検出されず、BN-PAGE は病原

性を判断する上で有用な手法と考えた。今回新規に検出したバリエーション (m.9173T>C) やこれまで BN-PAGE での異常が報告されていない変異を有する例についても、同様の subcomplex を検出し、病原性を支持する所見であった。また *MT-ATP6* や *MT-ATP8* 変異では変異の部位によらず共通の病態としてアセンブリ異常が存在することも示唆された。今回の症例における *MT-ATP6* の変異の多くは、立体構造上では *MT-ATP6* がコードするサブユニット a が、内膜部分を構成するサブユニット c と接する領域に集中しており、同部位でのサブユニット間の相互作用に影響すると考えた。同部位は複合体 V 内でプロトンが移動する経路の近傍であるため、変異により構造だけでなく機能も直接的に障害される可能性も考えられた。また mtDNA 上で *MT-ATP6* と *MT-ATP8* が重なって存在する *MT-ATP6/8* オーバーラップ領域の変異では holocomplex の減少や subcomplex の所見が著明であり、また凍結筋だけでなく培養細胞でも subcomplex を検出した。ここから同領域の変異では *MT-ATP6* の変異よりも複合体 V の構造に与える影響が大きいと考えた。評価対象試料による違いとしては、筋芽細胞・皮膚線維芽細胞よりも凍結筋を用いた場合に subcomplex の検出率が高かったが、m.8993T>G/C 変異例の解析では各試料での mtDNA 変異率は BN-PAGE の結果と明らかな相関はなく、変異率以外の要因を疑った。分裂を繰り返す培養細胞ではタンパクの代謝が速く、異常なアセンブリ中間体が分解されやすいのに対して、分裂しない骨格筋ではこれらが蓄積しやすいなどの原因を考えた。この結果から、BN-PAGE で解析を行う対象は培養細胞では不十分で、凍結筋での解析が望ましいと考えた。

一方、ATP 加水分解酵素活性では筋芽細胞・骨格筋のいずれにおいても有意な活性低下を示した症例がなく、BN-PAGE で明らかな構造異常を認めた例でも異常を検出できなかった。この原因として、複合体 V での ATP 合成は完全型複合体 V の状態でのみ可能となるのに対して、ATP 加水分解は subcomplex の状態であっても可能になってしまうためと考えた。以上より、今回の ATP 加水分解活性の測定方法では複合体 V 欠損症を検出することは困難であり、方法の再検討が必要と考えた。

**【結論】** *MT-ATP6* および *MT-ATP8* 変異による呼吸鎖複合体 V 欠損症では、BN-PAGE により複合体 V の構造異常 (subcomplex) を検出した。特に、培養細胞よりも凍結筋を用いた場合に検出率が高く、病原性が確立した変異を有する症例ではほぼ全例で subcomplex を検出し、BN-PAGE は変異・バリエーションの病原性の評価として有用な手法と考えた。一方、ATP 加水分解酵素活性の測定では、異常を検出することは困難であった。逆反応の測定では ATP 合成の障害が反映されない可能性があり、少なくとも今回の測定方法では ATP 加水分解活性測定は複合体 V の機能解析としては不適當と考えた。ミトコンドリア病の診断においては、解析対象の臓器をよく検討した上で、複数の評価方法を総合して判断することが重要である。