

審査の結果の要旨

氏名 内野 俊平

本研究は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 V (F1-Fo ATP 合成酵素) 欠損症の診断における生化学的評価の有用性を明らかにするために、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異による複合体 V 欠損症の多数の患者検体を用いて Blue native PAGE および酵素活性測定の手法で解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. mtDNA 上の *MT-ATP6* または *MT-ATP8* の様々な変異による複合体 V 欠損症 17 例について、患者由来筋芽細胞と凍結筋検体から抽出したミトコンドリアを用いて BN-PAGE で複合体 V の解析を行ったところ、筋芽細胞を用いた場合は 4 例、凍結筋を用いた場合は 11 例で、分子量の小さい異常な複合体 (subcomplex) を検出した。これは複合体 V のサブユニットが集合する過程が変異によって障害されたために、不完全な中間体が蓄積した結果と考えた。特に凍結筋を用いた場合は、病原性が確立した変異についてはほぼ全例で subcomplex を検出したことから、BN-PAGE は病原性を評価する上で有用な方法と考えた。

2. 評価対象試料ごとの subcomplex 検出率の違いの原因を検討するため、複合体 V 欠損症の原因として最も多い m.8993T>G/C 変異を有する 6 例について、筋芽細胞・凍結筋組織における mtDNA 変異率をパイロシーケンスにより測定した。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、検出率の違いは変異率以外の要因によるものと考えた。

3. 同じく患者由来の筋芽細胞、凍結筋検体から抽出したミトコンドリアを用いて、複合体 V の酵素活性を測定した。ATP 合成反応を直接測定するためには、新鮮筋を試料として調整する必要があり技術的に困難なため、逆反応である ATP 加水分解酵素活性を測定した。コントロールと比較して有意な ATP 加水分解活性低下を示した症例はなかった。変異によって生じた subcomplex は、ATP 合成は不可能であっても ATP 加水分解反応は可能となるため、加水分解活性の測定では本疾患での機能異常を検出できないと考えた。

以上、本論文では、多数の患者検体の解析から、呼吸鎖複合体 V 欠損症におけるミトコンドリア DNA 変異あるいはバリエーションの病原性を評価する方法として、筋組織を用いた BN-PAGE が有用であることを明らかにした。また、これまで BN-PAGE での異常が報告

されていなかった変異についても構造異常を検出し、複合体 V 欠損症では構造異常が主な病態であることを示す知見を得た。一方で、ATP 加水分解活性測定や培養細胞を用いた BN-PAGE は病原性の評価方法として不十分であるという課題を示した。本研究は複合体 V 欠損症の病態解明に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。