

Thesis

Blue native 電気泳動法を用いたミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断

埼玉医科大学 小児科部門

本多 正和

共同研究者： 原嶋 宏子 (埼玉医科大学 小児科部門)

大竹 明 (埼玉医科大学 小児科部門)

佐々木 望 (埼玉医科大学 小児科部門)

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis is a powerful tool for screening of mitochondrial respiratory chain disorders.

Masakazu Honda (Department of Pediatrics, School of Medicine, Saitama Medical University, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Abstract: Mitochondrial respiratory chain disorders are not only the most common but the most clinically diverse group of inborn errors of metabolism. It is often difficult to establish an accurate diagnosis and then to determine the molecular basis of respiratory chain disorders. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) is a form of native electrophoresis for resolving membrane protein complexes. We used BN-PAGE combined either with in gel enzyme staining or with immunoblotting to analyze 20 patients with possible, probable or definite mitochondrial respiratory chain disorders as defined by the criteria of Bernier et al. A potential complex I abnormality was detected in 11 out of 20 patients, but no abnormalities were found either in the amounts or activities of other complexes. Complex I abnormalities were categorized into three groups based on amount and size of assembled complex I. Combined with conventional enzyme assay, 4 out of 11 patients having complex I abnormality in BN-PAGE analyses were diagnosed as definite complex I deficiency. Tissue specificity in three sisters with complex I deficiency was also identified. We conclude that BN-PAGE is a powerful tool both in the correct diagnosis and as a useful guide to future molecular analysis for respiratory chain disorders.

Keywords: Blue native polyacrylamide gel electrophoresis; Mitochondrial respiratory chain disorders; In gel enzyme staining; Immunoblotting; Tissue specificity

緒 言

ミトコンドリア呼吸鎖異常症は最も頻度の高い先天代謝異常症で、少なく見積もってもその頻度は出生5,000人に1人とされている^{1,2)}。本症を迅速かつ正確に診断しかつその症例をうまく管理することは、共に非常に困難な課題である。罹患臓器は非常に多岐に渉り臨床症状も非常に多彩で、発症時期も新生児期から老年期まで全ての年齢に渉るからである。ミトコンドリア病が疑われた場合、最も有効で最も侵襲が少な

医学博士 甲第1041号 平成19年3月23日 (埼玉医科大学)

くそして最も安価な診断方法を探すことは、臨床医にとって非常に困難な課題である。30以上のミトコンドリア遺伝子異常のみならず40以上の核遺伝子異常がミトコンドリア病の病因として報告されている^{3,4)}。従って遺伝子診断をミトコンドリア病診断のスクリーニングとして利用することも非常に難しい。

Blue native ポリアクリルアミド電気泳動法 (以下BN-PAGEと略) は、膜に組み込まれて可溶化の非常に困難な大分子タンパク質の解析のために考案された方法⁵⁾である。我々はここに、呼吸鎖I異常が原因で先天性致死型水頭症を発症した3姉妹を例として取り上

げ, BN-PAGEがミトコンドリア呼吸鎖異常症の迅速診断とそれに続く分子学的解析に如何に有効であるかを呈示する.

対象と方法

対象症例と細胞

この研究は埼玉医科大学倫理審査委員会において審議され許可を受けて進められた. 対象となった症例の, 初発症状, 現在の状況, 臨床診断, 血中乳酸・ピルビン酸値を表1に示した. Bernierらのミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断基準⁶⁾において“可能性例 (possible)”以上の基準を満たした症例を検索対象とした. 臨床症状は, 新生児期致死性高乳酸血症から思春期の軽い筋緊張低下や食欲不振までに涉り非常に幅広い. 全20例中13例が, 新生児期から乳児期にかけて発病していた. 約4分の3の症例が, 先天性高乳酸血症や何かのミトコンドリア異常症と臨床診断されていたが, 重症ミトコンドリア病の代名詞でもあるLiegh様症候群と診断されていたのはわずかに1例であった. 男女比は9人:11人でほぼ同等であった. 20例中8例がその後の経過で死亡していた. 症例18の1例を除き, 全ての例で高乳酸血症と血中乳酸/ピルビン酸比の高値を認めた. 症例18においては, てんかん, ミオクロヌス, 網膜色素変性症など複数の臓器に渉る進行性の症状から, 高乳酸血症は無いにも関わらずミトコンドリア病の存在が疑われた.

線維芽細胞は皮膚または骨髄から採取した.

症例1とその姉妹

今回の我々の検索で呼吸鎖 I 異常症と確定診断された症例1と, その姉及び妹の病歴を以下に簡単に記す. 第1子は在胎32週1日, 1,418gで, 胎児切迫仮死の為緊急帝王切開にて出生した女児である. 両親に血族関係はない. 当初より呼吸循環動態が落ち着かず気管内挿管を施行し人工呼吸管理を行ったが, 病状安定せず日齢16において肺出血, 播種性血管内凝固症候群の為に死亡した. 患児は胎児期よりエコー上水頭症を指摘されていた. この児は乳酸, ピルビン酸は未測定であった.

2年後同夫婦間で第2子(女児)の妊娠が判明した. 在胎30週頃より, 第1子同様胎児エコーにて脳室拡大を指摘されていた. 在胎37週4日2,134gで帝王切開にて出生し, アプガースコア6点(1分)/8点(5分)であった. 出生時の呼吸循環動態は安定していたが, 活動性, 筋緊張の低下が著明でその後すぐに人工呼吸器管理となり, 当院NICUへ入院となった. 入院時検査所見では血糖31 mg/dl, 血液ガス分析(静脈血)所見として軽度のアシドーシス(pH 7.309, pCO₂ 35.5 mmHg, pO₂ 34.7 mmHg, BE-6.8 mM, HCO₃-18.0 mM)を認めていた. その後日齢20までに徐々にアシドーシスは増悪(pH 7.302, pCO₂ 26.0 mmHg, pO₂ 70.4 mmHg, BE-13.6 mM, HCO₃-13.0 mM)し, この時に測定した血中と髄液中の乳酸値が, それぞれ8.5 mM, 15.4 mM(正常値は血中, 髄液中共に1.8 mM以下)と著明に上昇しており, 血中乳酸/ピルビン酸比も47.2(正常20

Table 1. Initial symptom, clinical status and diagnosis and lactate/pyruvate levels of 20 Japanese patients

Patient	M/F	Initial symptom	Status	Clinical diagnosis	Blood lactate/pyruvate (normal: <1.8/<0.1 mM)
1	F	Congenital hydrocephalus (0 d)	Dead (2 mo)	Congenital lactic acidosis	8.5/0.18
2	M	Feeding difficulty (6 d)	Dead (0 mo)	Congenital lactic acidosis	11.3/0.4
3	M	Hypotonia (7 y)	Alive (8 y)	Mitochondrial myopathy (RRF+)	1.2-3.8/0.1
4	F	Impaired hearing (0 mo)	Alive (1 y)	Mitochondrial disorder (RRF+)	3.9-12.6/0.26-0.38
5	F	Impaired hearing (7 y)	Alive (13 y)	MERRF (RRF+)	3.4/0.1
6	F	Left hand hemiparesis (7 y)	Alive (9 y)	MELAS	4.8/0.18
7	M	Feeding difficulty (1d)	Dead (0 mo)	Congenital lactic acidosis	30.9/0.6
8	F	Congenital hydrocephalus (0 d)	Dead (4 d)	Lethal infantile mitochondrial disease	40.9/0.7
9	M	Status epilepticus (13 mo)	Dead (13 mo)	Acute encephalopathy	10.5/0.28
10	F	Feeding difficulty (4 mo)	Alive (11 mo)	Congenital lactic acidosis	4.4-6.3/0.14-0.32
11	M	Esophageal atresia (in Fetus)	Alive (3 mo)	Multiple organ failure	20.6/0.74
12	F	Tachypnea (1d)	Dead (2 y)	Lactic acidosis and methylmalonic acidemia	33.3/0.78
13	F	Hypotonia (0 d)	Alive (10 mo)	Congenital lactic acidosis	24/0.92
14	F	Developmental delay (8 mo)	Alive (8 mo)	Congenital lactic acidosis	5.8/0.66
15	M	Neonatal asphyxia, MAS (0 d)	Dead (1 mo)	Leigh-like disease	12.6/0.25
16	M	Failure to thrive, vomiting (3 mo)	Alive (1 y)	Infantile spasms	5.6-6.7/0.17-0.23
17	M	Convulsion (3 y)	Dead (4y-1mo)	Reye-like syndrome	11.9/0.29
18	M	Convulsion (11 y)	Alive (17 y)	Epilepsy	1.7/0.11
19	F	Very low birth-weight infant (24weeks, 700g)	Alive (6 mo)	Congenital lactic acidosis	7.7/0.23
20	F	Anorexia (14 y)	Alive (14 y)	Congenital lactic acidosis	12.3/0.42

MAS, meconium aspiration syndrome; RRF, ragged red fiber; MERRF, myoclonic epilepsy with RRF; MELAS, mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes.

以下)と著増していた。また頭部MRIでは脳室拡大と、脳室周囲の小嚢胞を認めた。その後アシドーシスの補正及びビタミンB1、ジクロル酢酸ナトリウムの投与を行うも症状は改善せず、最終的に敗血症を契機に生後4ヶ月で死亡した。

第3子も同様に胎児期から脳室拡大があり、在胎36週4日、2,196gで帝王切開にて出生した。やはり高乳酸血症を呈しており、ご両親の同意の上保存的療法のみにて経過観察とし、日齢8に死亡した。

生化学的検索

線維芽細胞の培養は既報⁷⁾に従った。ミトコンドリアはArganらの方法⁸⁾に基づいて単離した。個々の呼吸鎖酵素及び対照としてのクエン酸合成酵素(citrate synthase; CS)活性は、既報^{7,9)}に従った。即ち肝臓と心臓は粗ホモジェネートを直接に、線維芽細胞は単離したミトコンドリア画分を測定サンプルとした。呼吸鎖I活性はCSとの相対比で表し、対照35人の平均に対するパーセントで示した⁷⁾。

Blue native 電気泳動法(BN-PAGE)を用いた解析

単離したミトコンドリア画分は使用まで-80℃冷凍庫に保存した。線維芽細胞及び羊水細胞から単離したミトコンドリアは、既報^{10,11)}通りに界面活性剤であるドデシルマルトシドで可溶化し、BN-PAGEとそれに続くイムノブロット法を用いて呼吸鎖複合体の量と大きさを解析した。各複合体の解析に用いた抗体は以下のサブユニットに対するもので、いずれもMolecular Probe社から購入した。呼吸鎖I, 39 kDaサブユニット;呼吸鎖II, 70 kDaサブユニット;呼吸鎖III, コア1サブユニット;呼吸鎖IV, サブユニット1。スーパー複合体+複合体Iまたは複合体I単独の複合体IIに対する相対比は、Biorad GS-800 Calibrated Densitometerで定量し、3回のBN-PAGE&イムノブロット実験の平均値で表した。なおここで言うスーパー複合体とは複合体I+III+IVから成り、呼吸鎖I, III, IVを検出する際に、それぞれの複合体単独のシグナルと共に必ず検出される複合体シグナルである。毎回の実験においては1枚のゲルに2つの対照を同時に流し、この2つの対照の相対比の平均を100%として計算した。各呼吸鎖複合体のゲル内活性染色も既報¹²⁻¹⁴⁾に従った。

結果と考察

代表的6症例の複合体IとIIについてのBN-PAGE&イムノブロット解析結果を図1に示す。この6症例のうち、症例7, 8, 18が後述するように呼吸鎖I異常症確定例と診断された。呼吸鎖複合体IのIIに対する相対的存在比は、症例8と12で著明に減少、症例7と18で中程度に減少している。症例4ではスーパー複合体の量が複合体Iの量に比べて多い。症例15ではスーパー複合体と複合体Iの間に通常では観察されない複合体のシグナルが観察される。

解析した20症例の呼吸鎖複合体Iの量と活性の結果を表2に示す。BN-PAGE & イムノブロット解析において呼吸鎖Iの何らかの異常が20例中11例に認められたが、呼吸鎖II, III, IVについては、いずれの例でもその量にも活性にも異常を認めなかった。4人の対照より得た線維芽細胞を用いたBN-PAGE&イムノブロット実験では、スーパー複合体+複合体Iまたは複合体I単独の複合体IIに対する相対比は、両者共に70~130%の間に収まった(データは未呈示)。このデータを基に、我々は観察された呼吸鎖複合体Iの異常を3群に分類した。第1群はスーパー複合体+複合体Iまたは複合体I単独の複合体IIに対する相対比が30%以下となる著減群で、症例8と12がこの群に属する。第2群は相対比が30~70%の減少群で、症例1, 3, 6, 7, 14, 18と19がこの群に属する。第3群はBN-PAGE&イムノブロット上で通常は認められない異常なシグナルを認めるもので、図1に示した症例4と15がこの群に属する。以前に我々が報告したNDUFS6異常症¹¹⁾に認められたような小さなシグナルは、今回はいずれの症例においても認められなかった。

診断を進めるために、BN-PAGE上で異常の認められたこれら11例の線維芽細胞から単離したミトコンドリアを用いて呼吸鎖I酵素活性の測定を行った。表2に示すように、CSに対する呼吸鎖I酵素活性比が30%以下に低下している症例7, 8と18はBernierの基準⁶⁾における大基準を1つ獲得したことになる。大基準2つまたは大基準1つに小基準2つを満たせば確実例と診断するこの基準を用いれば、この3症例は全例呼吸鎖I異常症の確実例に該当した。

症例1のBN-PAGEを用いた各呼吸鎖のイムノブロットと活性染色の結果を図2に示す。ゲル内活性染色では、呼吸鎖II, III, IV活性が正常であるのに比較して、明らかに呼吸鎖I活性のみが低下している。図2に示したように、症例1の線維芽細胞を用いた呼吸鎖I酵素活性は49%と軽度の低下を示しているに過ぎない。培養線維芽細胞には呼吸鎖I以外にも非常に多くの非特異的NADH酸化酵素が含まれており¹³⁾、それが測定上のバックグラウンドとなり酵素活性が見かけ上上昇することがある。呼吸鎖I以外のNADH酸化酵素は全て呼吸鎖Iに比較してはるかに分子量が小さく、BN-PAGEで解析すれば多くはゲルから流れ出すか少なくとも呼吸鎖Iからかなり離れた位置に泳動される。それに加えてBN-PAGEの焦点効果により、各呼吸鎖はゲルの中で1つのバンドに集中する。以上の理由で、通常行われている酵素活性測定に比較してBN-PAGEを用いた活性染色の方が生体内の酵素活性をより良く反映している可能性がある。

それでも症例1の臨床的重症度は、線維芽細胞を用いて測定した酵素活性の軽度低下とは相容れない。その説明として組織特異性を考え、凍結保存して

あった症例1の肝臓, 心臓を用いて酵素活性を測定した. 図3に示すように, 呼吸鎖 I 残存活性は線維芽細胞での軽度低下 (49%) に比して, 肝臓 (6%), 心臓 (10%) では著明に低下しており, 呼吸鎖 I 異常症と確定診断した. ミトコンドリアの全塩基配列を決定したところ異常を認めず (データ未呈示), 症例1の原因は核遺伝子異常であると考えられた. 今までに呼吸鎖 I 異常症の病因として報告されている核遺伝子の多くがハウスキーピング遺伝子であるにもかかわらず,

臨床的, 生化学的な組織特異性はかなりの症例で認められている¹⁵⁾. 特定の細胞, 組織が選択的に影響を受ける理由は未だに不明である. この症例1も含めて BN-PAGE 解析で呼吸鎖 I に異常を認めた11例中4例が呼吸鎖 I 異常症と確定診断できた.

BN-PAGE 解析で呼吸鎖 I に異常を認めた残りの7例中, 病理組織上の大基準であるragged red fiberを呈している症例3と4は, 症状及び高乳酸血症と合わせていずれかの呼吸鎖異常症と確定診断できる. 我々

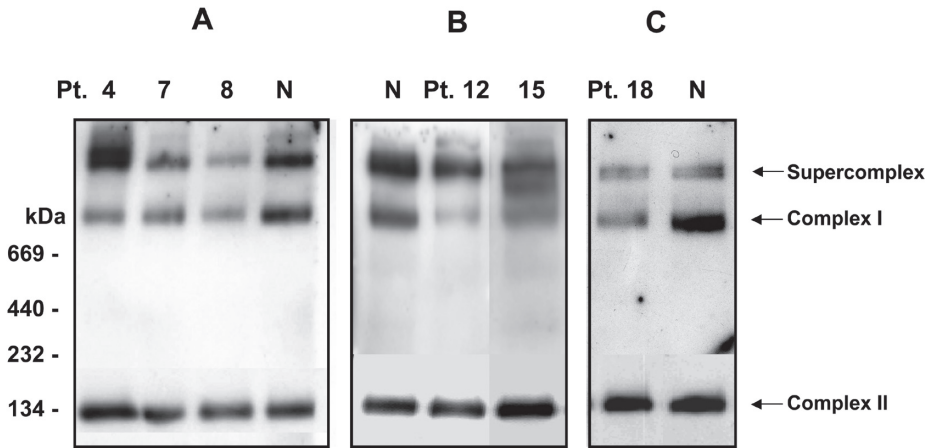


Fig 1. Analysis of complex I amount by BN-PAGE in six representative patients. Mitochondria isolated from patients 4, 7, 8, 12, 15, 18 and control (N) fibroblasts were solubilized in dodecyl maltoside and subjected to BN-PAGE and Western blotting. The results of three separate experiments (A, B and C) are shown. The relative amount of both assembled supercomplex and complex I was markedly decreased in patient 8. The relative amount of assembled complex I was dramatically decreased in patient 12 and moderately decreased in patients 7 and 18. The relative amount of supercomplex was always much higher than that of complex I in patient 4. In patient 15, an abnormally assembled species was seen between supercomplex and complex I.

Table 2. Relative amount and residual activity of complex I in primary fibroblasts of 20 Japanese patients

Patient	M/F	Amount		Activity
		% Assembled SC plus Col/Coll (normal range: 70-130%)	% Assembled Col/Coll (normal range: 70-130%)	% Col/CS (normal range: 50-145%)
1	F	64	69	49
2	M	100	100	
3	M	68	84	99
4	F	93 (Always SC >> Col)	78	47
5	F		78	
6	F		70	189
7	M	42	62	10
8	F	20	29	28
9	M	88	80	
10	F	71	71	
11	M	87	71	
12	F	35	15	100
13	F	97	98	
14	F	71	64	63
15	M	82 (Sub-SC)	73	73
16	M		88	
17	M	100	99	
18	M	61	57	14
19	F	61	59	58
20	F	73	74	

SC, supercomplex; Col, complex I; Coll, complex II; CS, citrate synthase; Sub-SC, sub-supercomplex.

は症例 12 と 15 で認められた BN-PAGE 上の明確な異常は、小基準の 1 つである“抗体染色による呼吸鎖酵素欠損の証明”に準ずるものと考えている。そうすればこの 2 症例も、症状及び高乳酸血症と合わせて呼吸鎖異常症の可能性例 (possible) から疑い例 (probable) への昇格が可能である。以上を要約すると、BN-PAGE 解析で呼吸鎖 I に異常を認めた 11 症例中、4 例が呼吸鎖 I 異常症確定例、2 例がいずれかの呼吸鎖異常症確定例、そして 2 例が呼吸鎖異常症の疑い例になり、BN-PAGE の診断能力の高さが証明できたと考える。

BN-PAGE は呼吸鎖酵素複合体の完全な形で活性を

保った状態での解析を可能とする。BN-PAGE ゲル内活性染色が、通常行われている酵素活性測定に比して生体内の酵素活性をより良く反映している可能性があることは上述した。さらに BN-PAGE 後のイムノブロット解析を行えば、市販抗体を用いて複合体の量と大きさが解析できる。我々の解析結果は、呼吸鎖 I 異常症が BN-PAGE 上で少なくとも 3 つのカテゴリー—著減、減少、異常なシグナラー—to 分類できる事を示した。BN-PAGE 後の活性染色とイムノブロット解析で、ミトコンドリア呼吸鎖異常症の迅速で正確な診断が可能となった。さらに BN-PAGE が、将来呼吸鎖異常症を分子学的に分類しミトコンドリア呼吸鎖自身の由来をも探るための有力な手段になることは疑いのない事実である。

謝 辞

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金・基盤研究 (C)・課題番号 16591052 の補助を得て行われた。稿を終えるに当たり、村山 圭先生 (千葉県こども病院代謝科)、David R Thorburn 博士 (Murdoch Childrens Research Institute, Melbourne, Australia)、Mike T Ryan 博士 (La Trobe University, Melbourne, Australia) の 3 氏には BN-PAGE、酵素活性測定はじめ多岐に渡り、多大なご尽力を賜りましたことに深謝致します。また、症例の細胞をご提供頂いた臨床の諸先生方、酵素活性測定のご指導をいただいたメルボルン MCRI の Simone Tregoning 嬢と Michiel van Werkoven 氏、及び症例 1 のミトコンドリア遺伝子解析を行って頂いた国立精神神経センターの後藤雄一博士に深謝致します。本論文の要旨は The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (2006 年 千葉) において発表し、ワークショップ演題として採択された。

REFERENCES:

- 1) Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* 2003;126:1905-12.
- 2) Triepels RH, Van Den Heuvel LP, Trijbels JM, Smeitink JA. Respiratory chain complex I deficiency. *Am J Med Genet* 2001;106:37-45.
- 3) Thorburn DR, Sugiana C, Salemi R, Kirby DM, Worgan L, Ohtake A, et al. Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. *Biochim Biophys Acta* 2004;1659:121-8.
- 4) Robinson BH. Lactic acidemia and mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 2006;89: 3-13.
- 5) Schägger H. Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* 2001;65:231-44.

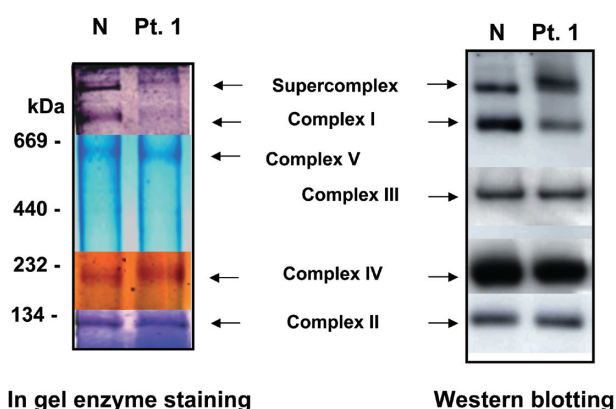


Fig 2. Analyses of complex I activity and amount by BN-PAGE in patient 1.

Mitochondria isolated from patient 1 (Pt. 1) and control (N) fibroblasts were solubilized in dodecyl maltoside and subjected to BN-PAGE and Western blotting. Deficient activity in complex I was clearly demonstrated by in gel enzyme staining, whereas the amount of fully assembled complex I relative to complex II was shown to be mildly decreased (69%). Activities of complex II, IV, and V, and amount of complexes II, III, and IV were all comparable to those in the normal control.

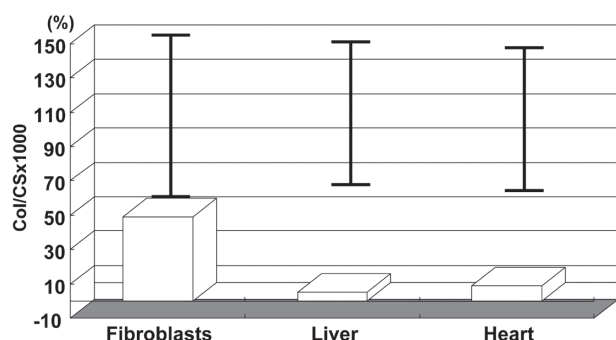


Fig 3. Residual complex I activities in fibroblasts, liver and heart in patient 1.

Complex I (CoI) activity in patient 1 was expressed relative to the activity of the matrix marker enzyme citrate synthase (CS), as a percentage of the control mean for each tissue. Bars represented the normal range. Residual complex I activities were clearly deficient both in liver (6%) and heart (10%), but only moderately decreased in fibroblasts (49%).

- 6) Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 2002;59:1406-11.
- 7) Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* 1999;52:1255-64.
- 8) Argan C, Lusty CJ, Shore GC. Membrane and cytosolic components affecting transport of the precursor for ornithine carbamyltransferase into mitochondria. *J Biol Chem* 1983;258:6667-70.
- 9) Rahman S, Blok RB, Dahl HHM, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, et al. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 1996;39:343-51.
- 10) Kirby DM, Boneh A, Chow CW, Ohtake A, Ryan MT, Thyagarajan D, et al. Low mutant load of mitochondrial DNA G13513A mutation can cause Leigh's disease. *Ann Neurol* 2003;54:473-8.
- 11) Kirby DM, Salemi R, Sugiana C, Ohtake A, Parry L, Bell KM, et al. NDUF5 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency. *J Clin Invest* 2004;114:837-45.
- 12) Dabbeni-Sala F, Di Santo S, Franceschini D, Skaper SD, Giusti P, Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. *FASEB J* 2001;15:164-70.
- 13) Van Coster R, Smet J, George E, De Meirleir L, Seneca S, Van Hove J, et al. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a powerful tool of oxidative phosphorylation defects. *Pediatr Res* 2001;50:658-65.
- 14) Dubowitz V, Sewry CA, Fitzsimons RB. *Muscle Biopsy: a practical approach*. 2nd Ed. London: Bailliere Tindall Co; 1985.
- 15) Shoubridge EA. Nuclear gene defects in respiratory chain disorders, *Semin Neurol* 2001;21:261-7.